

УДК 577.151 + 597.2/.5 + 543.275.2

К. В. Костюк¹, В. В. Грубінко¹, В. О. Хоменчук¹,
О. М. Арсан²

**ФУНКЦІОНУВАННЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗ У
ЗЯБРАХ КОРОПА (*CYPRINUS CARPIO L.*) ЗА ДІЇ
НАФТОПРОДУКТІВ**

Досліджено вплив нафтопродуктів на АТФ-азну активність зябер коропа. Встановлено, що невеликі концентрації дизельного палива (1, 5 ГДК) не тільки не мають токсичного ефекту, а й підвищують здатність риб до виживання. Зате токсична (10, 20 ГДК) дія нафти на організм гідробіонтів позначається, головним чином, зміною проникності клітинних мембран за участю АТФ-азної системи.

Ключові слова: АТФ-ази, нафтопродукти, *Cyprinus carpio L.*, адаптація.

Зростання нафтового забруднення стало одним з лімітуючих чинників формування якості води та біопродуктивності гідроекосистем [1, 10]. Під поняттям «нафтопродукти» розуміють складну, непостійну і різноманітну суміш речовин, що може містити низько- і високомолекулярні насичені, ненасичені аліфатичні, ароматичні вуглеводні, кисневмісні, азотисті, сірковмісні сполуки, а також ненасичені гетероциклічні сполуки типу смол, асфальтенів, ангідридів, асфальтенових кислот тощо. Характерною особливістю цих сполук є те, що вони повільно руйнуються в природних умовах, змінюють форму перебування, поступово накопичуючись у різних компонентах екосистеми. У воді відбувається фізико-хімічне перетворення та біодеградація нафтопродуктів, що призводить до появи ще ширшого кола речовин з агресивними щодо біоти властивостями. Існує два типи дії цих речовин на гідробіонтів: плівковий ефект (1 л нафти при розливі на 1 га формує плівку завтовшки 0,10—0,01 мм [14]; емульгування молекулярного шару нафти (призводить до довготривалого перебування окремих фракцій нафти у товщі води у вигляді включень). Механізми дії нафтопродуктів пов'язані зі зміною ними термодинамічної рівноваги та виникненням пролонгованих фізико-хімічних ефектів довготривалої дії: температурні аномалії (температурний контраст між чистою водою й водою, забрудненою нафтопродуктами, пов'язаний з більш низькою теплопровідністю нафти і нафтопродуктів (у 3—6 разів) і теплоємністю (у 1,5—2,5 разу) порівняно з водою; перешкоджання надходженню до контактних із середовищем клітин організмів кисню та порушення газового і іонного обміну в мембранах; прямий хімічний вплив на складові мембран клітин за рахунок адсорбції та розчинення окремих нафтопродуктів у гідрофобних компонентах мембран [1]. Крім того, у

© Костюк К. В., Грубінко В. В., Хоменчук В. О., Арсан О. М., 2010

водоймах на тлі нафтового забруднення значніше щодо біоти проявляється дія інших ксенобіотиків, з якими нафта дає синергічний ефект [11].

Аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури свідчить про відсутність єдиної точки зору щодо питання токсичності різних фракцій нафти на водяні організми. Однак відомо [9], що ступінь токсичності та кумулятивний ефект нафтопродуктів стоять у прямій залежності від їх розчинності у воді. Сполуки водорозчинної фракції нафти, переважно леткі аліфатичні та моноядерні ароматичні вуглеводні, здатні проникати через клітинні мембрани, в тому числі й через зяброві [1]. Тому для біомоніторингу забруднення водного середовища поліциклічними вуглеводнями часто використовують рибу. Крім того, риби є прикінцевою ланкою ланцюга живлення водойм, у якій концентрується більшість токсичних продуктів. З морських риб найбільш чутливою до поліциклічних вуглеводнів та нафтопродуктів є камбала, а серед прісноводних — ставковий короп, який саме завдяки цьому [1] обраний об'єктом дослідження.

Водорозчинні поліциклічні вуглеводні накопичуються в печінці риб. Нафта негативно діє на серце, змінює дихання, збільшує печінку, уповільнює ріст, впливає на поведінку риб [4]. Продукти метаболізму цих сполук можуть ковалентно зв'язуватись з ДНК, що призводить до розвитку канцерогенезу [5]. В умовах хронічного нафтового забруднення у низки гідробіонтів збільшується кількість окремих ліпідних фракцій та сумарного вмісту ліпідів [8]. Однак, насамперед, інтерес становить механізм проникнення вуглеводневих компонентів нафти в організм риб, оскільки згідно з припущенням Н. С. Строганова (1973) [1], об'єкт, що зазнає впливу в першу чергу, є мембрана. Саме тому досить важливо є з'ясувати те, як змінюється функціональна активність мембран, про яку можна судити, насамперед, за активністю мембранних АТФ-аз.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження здійснені на коропах (*Cyprinus carpio* L.) дворічного віку масою 250—300 г. Необхідну концентрацію нафтопродуктів у воді, що відповідала 1, 2, 5, 10, 20 і 30 рибогосподарським ГДК (0,05 мг/дм³), створювали розчиненням у ній дизельного палива (ДП), що обрано для експерименту з огляду на його досить високу розчинність у воді. В експериментах риб (по 6 особин) утримували в лабораторних акваріумах місткістю 200 л. Період аклімації риб становив 14 діб.

Досліджували АТФ-азну активність у мембранах клітин зябер. Наважки тканини (0,50 г) гомогенізували в 2,50 мл трис-НСІ буфера, рН 7,20, після чого центрифугували при 3000 г 10 хв. Активність АТФ-аз визначали за наростанням неорганічного фосфату в інкубаційному середовищі такого складу: 0,50 мл 40,0 ммоль трис-НСІ-буфера, 0,10 мл 5,00 ммоль АТФ, 0,10 мл 20,00 ммоль КСІ (для Ca²⁺-, Mg²⁺-АТФ-ази — 0,10 мл 100 ммоль КСІ), 0,10 100 ммоль NaCl (для Ca²⁺-, Mg²⁺-АТФ-ази — без NaCl, але з оубаїном), 0,10 мл 5,00 ммоль MgCl₂ і 0,20 мл гомогенату тканини [12]. Час інкубації суміші становив 40 хв. Для зупинення реакції додавали 0,4 мл 10% ТХОК і центрифугували при 3000 г 10 хв. До центрифугату для визначення вмісту неорганічного фосфату додавали 1,50 мл 1,00 моль ацетатного буфера (CH₃COONa + CH₃COOH), 0,20 мл молібдату амонію і 0,20 мл 2% розчину аскорбінової кис-

лоти, витримували 20 хв і фотометрували при довжині хвилі 600 нм. Визначення вмісту білків здійснювали за Лоурі та співавт. [13]. Активність ферменту виражали у мкмоль P_n /хв в 1 мг білка. Одержані результати опрацьовано методами варіаційної статистики.

Результати досліджень та їх обговорення

Як відомо, зябра риб є органом, який безпосередньо контактує з водним середовищем і тому зяброві клітини швидко реагують на дію токсикантів. Виходячи з властивостей нафти та її продуктів, перш за все, аполярності молекул, легкої проникності в клітини, розчинності у ліпідах, а також із сучасного уявлення про будову біологічних мембран та їх роль у життєвих процесах, можна передбачити, що вуглеводні нафти, проникаючи в клітинну мембрану, впливають на ліпіди, змінюють плинність мембран, а разом з цим впливають на функціональний стан ліпопротеїдних комплексів, насамперед АТФ-залежних транспортних систем [1, 6].

Як показали наші дослідження, активність загальної АТФ-ази в зябрах коропа залежить від концентрації дизпалива у воді (рис. 1). Так, за рівня у воді дизпалива 1 ГДК АТФ-азна активність зростає порівняно з контролем і сягає максимального значення, виявленого в експерименті взагалі. Можна припустити, що це пов'язано із миттєвим ущільненням мембрани за дії дизельного палива внаслідок утворення плівки на поверхні клітин, що утруднює її проникність та, відповідно, активацію АТФ-аз як компенсаторної відповіді. Зі збільшенням вмісту дизельного палива до 5 ГДК активність ферменту в зябрах коропа знижується, але залишається дещо вищою порівняно з контролем. Подальше зростання концентрації дизпалива до 10 і 20 ГДК також викликає активацію АТФ-ази, але незначну порівняно з концентрацією 1 ГДК. Після первинної відповіді АТФ-азної системи на дію токсиканту, що виражалася у її активації більше ніж у два рази, за подальшого поступового наростання концентрацій дизпалива та збільшення часу інкубації можна припустити формування в клітинах стрес-реакції на токсикант в межах норми реакції, яка сягає нового (адаптивного) рівня при концентрації 30 ГДК, коли спостерігається підвищення АТФ-азної активності не тільки порівняно з попередніми концентраціями (10 і 20 ГДК), а й з її показниками у контролі. Отже, в цілому можна констатувати достатньо високу функціональну стійкість АТФ-азного комплексу мембран клітин зябер коропа до дії дизельного палива.

Щодо активності Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-ази, то при концентрації нафтопродуктів 1 ГДК має місце, як і у випадку загальної активності АТФ-аз, максимальна активація ферменту (практично у чотири рази проти контролю) (рис. 2). За вмісту дизпалива 5 ГДК активність Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-ази зменшується порівняно з 1 ГДК, а при подальшому збільшенні концентрації нафтопродукту до 10, 20 і 30 ГДК спостерігається тенденція до зменшення активності Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-ази навіть порівняно з показником у контролі більше ніж у три рази.

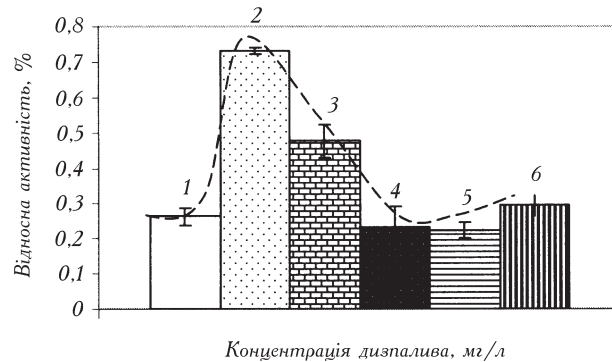
З огляду на отримані дані, активація Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-ази також є первинною стрес-реакцією на токсикант з метою підтримання на нормальному

функціональному рівні іонного обміну в мембрані. Проте високі концентрації дизельного палива, очевидно, інгібують фермент з можливою втратою ним функцій та наступним порушенням іонного транспорту в клітинах.

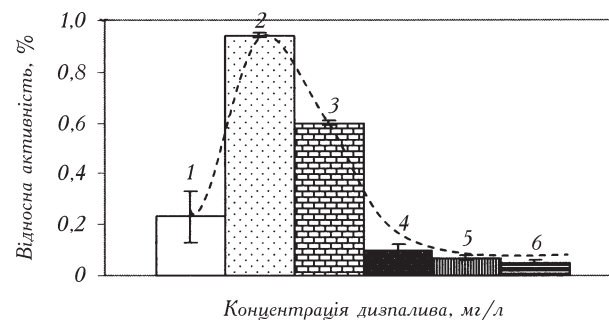
Аналіз динаміки концентраційної залежності активності загальної та частково Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-ази свідчить, що в обох випадках (рис. 3) профіль отриманих кривих близький кривій розвитку адаптації організмів до несприятливих чинників середовища існування, оскільки низькоконцентраційний вплив викликає первинну активацію ферментів (пік активності), що спадає нижче початкового рівня за середньоконцентраційного впливу та дещо збільшується (відновлюється) до рівня контролю або трохи більше за довготривалого впливу речовини (формується адаптація) [2, 3].

Аналіз отриманих даних про активність загальної та Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-ази дозволив розрахувати активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, яка є протилежною відносно Mg^{2+} -, Ca^{2+} -АТФ-ази. Отримані дані свідчать про те, що при максимальній активності Mg^{2+} -, Ca^{2+} -АТФ-ази активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази максимально інгібуються, а при зменшенні — зростає. Ймовірно, що це пов'язано зі зміною іонного транспорту у мембранах, насамперед, зі зміною дизпаливом іонного потенціалу на мембранах через порушення її деполізації.

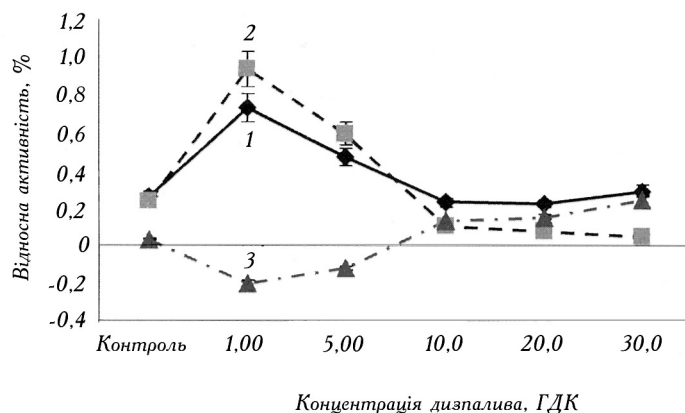
За миттєвої дії дизельного палива уже в низьких концентраціях (1 ГДК), ймовірно, в першу чергу інгібуються транспорт одновалентних іонів — Na^+ і K^+ . Тому з метою функціональної компенсації порушеного мембранного



1. Вплив дизельного палива на загальну активність АТФ-аз у зябрах коропа ($M \pm m$; $n = 5$): 1 — контроль; 2 — 1 ГДК; 3 — 5 ГДК; 4 — 10 ГДК; 5 — 20 ГДК; 6 — 30 ГДК.



2. Вплив дизельного палива на активність Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-ази у зябрах коропа ($M \pm m$; $n = 5$): 1 — контроль; 2 — 1 ГДК; 3 — 5 ГДК; 4 — 10 ГДК; 5 — 20 ГДК; 6 — 30 ГДК.



3. Динаміка активності загальної, Ca²⁺-, Mg²⁺- та Na⁺, K⁺-АТФ-аз у зябрах коропа за дії дизельного палива ($M \pm m$; $n = 5$): 1 — загальна АТФ-азна активність; 2 — активність Mg²⁺-, Ca²⁺-АТФ-ази; 3 — активність Na⁺, K⁺-АТФ-ази.

транспорту для підтримання мембранного потенціалу та іонного обміну активується система транспорту двовалентних іонів — Mg²⁺ і Ca²⁺. Вичерпання її можливостей за рівня дизпалива 5 і, особливо, 10 ГДК знову сприяє певному (адаптивному) відновленню активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази. Тому можна припустити взаємопов'язаність і компенсаторну взаємодоповнюваність АТФ-азних транспортних систем у клітинах зябер коропа за розчинення дизельного палива у ліпідній фракції мембрани, зміні ним таким чином її плинності, щільності, а отже і проникності та поляризації [6].

Щодо концентраційно-часового механізму реакції АТФ-аз на дію токсикантів, то встановлена в цьому експерименті закономірність (рис. 3) збігається з раніше виявленою нами фазовою реакцією АТФ-аз одноклітинної водорості *Desmodesmus communis* (= *Scenedesmus quadricauda*) Brev. на дію іонів важких металів (свинцю і цинку) в концентрації 1—5 ГДК [7]. В цілому для мембран клітин водорості виявлено інгібування АТФ-азної активності незалежно від концентрації металів протягом трьох діб, після чого активність ферменту відновлювалася, а починаючи з десятої доби зростала. Фазовість відповіді АТФ-азних систем в обох досліджених випадках узгоджується з відомим ефектом розвитку відповіді гідробіонтів на дію токсикантів залежно від концентрації та в часі [2, 3], що включає стадії пригнічення метаболічних реакцій і фізіологічних функцій внаслідок первинного токсичного стресу, формування толерантності до токсиканту з наступною активацією захисних (адаптивних) систем. Виходячи із зазначеного, припускаємо існування єдиного механізму реакції АТФ-аз мембран клітин різних за рівнем організації гідробіонтів на токсичну дію: на первинних етапах дії різних за фізико-хімічною природою токсикантів має місце активація ними мембранних АТФ-аз та мембранного транспорту, після чого настає фаза пригнічення (інгібування) з наступним їх відновленням, навіть активацією, в процесі формування у водоростей та коропа адаптивних метаболічних систем захисту від токсикантів, що забезпечують формування толерантності організму до цих чинників в цілому.

Висновки

Дизельне паливо, вміст якого становить 1, 5 і 30 рибогосподарських ГДК, підвищує загальну АТФ-азну активність у зябрах коропа, що можна пояснити структурними перебудовами мембран, зокрема їх ущільненням при дії токсиканту. Малі концентрації дизельного палива активують Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФ-азу у зябрах коропа, а великі — інгібують.

При максимальній активності Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФ-ази активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази максимально інгібується, а при зменшенні активності Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФ-ази має місце зростання Na^+ , K^+ -АТФ-ази. Ймовірно, що це пов'язано зі зміною іонного транспорту у мембранах, насамперед, зі зміною дизпаливом іонного потенціалу на мембранах через порушення її деполяризації.

Фазовий ефект зміни активності АТФ-аз зябер за дії дизпалива є аналогічним динаміці активності ферменту в одноклітинній водорості *Desmodesmus communis* (= *Scenedesmus quadricauda*) Brev. за дії іонів важких металів (свинцю і цинку), що дозволяє прогнозувати можливе існування єдиного механізму відповіді АТФ-аз у різних видів гідробіонтів за дії різноманітних за фізико-хімічною природою і токсичністю ксенобіотиків.

**

Исследовано влияние нефтепродуктов на АТФ-азную активность жабер карпа. Установлено, что небольшие концентрации дизельного топлива (1, 5 ПДК) не только не имеют токсического эффекта, но и повышают способность рыб к выживанию. Токсическое воздействие нефти (10, 20 ПДК) на организм гидробионтов проявляется, главным образом, в изменении проницаемости клеточных мембран.

**

An effect of oil products on the activity of ATP-as in the branchiaes of carp are studied. It is established that small concentrations of fuel-oil (1, 5 MTC) not only does not have a toxic effect, but promote the capacity of fish for a survival. But toxic action (10, 20 MTC) of oil on the organism of hydrobionts reflected mainly in change of permeability of cellular membranes, with participation of ATP-as system.

**

1. Биологические аспекты нефтяного загрязнения морской среды / Под ред. О. Г. Миронова. — Киев: Наук. думка, 1988. — 246 с.
2. Грубінко В.В. Інтегральна оцінка токсичного ураження у біологічних системах // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер.: Біологія. — 2005. — № 3 (26). — С. 111—114.
3. Грубінко В.В. Системна оцінка метаболічних адаптацій у гідробіонтів // Там же. — 2002. — № 2 (14). — С. 36—39.
4. Зубина Н.Ф., Сергеева В.Т., Кардакова М.В. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые физиолого-биохимические особенности организма карпа // Экол. физиология и биохимия рыб. — Астрахань, 1979. — Т. 1. — С. 82—93.

5. Коржуев П.А. Некоторые проблемы биохимии рыб // Обмен веществ и биохимия рыб. — М.: Наука, 1967. — С. 243—247.
6. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Поверхностно-активные вещества как инструменты исследования биомембран. — Киев: Наук. думка, 1993. — 262 с.
7. Костюк К.В., Богнар О.І., Грубінко В.В. Вплив іонів Zn^{2+} та Pb^{2+} на активність АТФ-аз у одноклітинної водорості *Desmodesmus communis* (= *Scenedesmus quadricauda*) Brev. // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер.: Біологія. — 2008. — № 2 (36). — С. 143—148.
8. Маляревская А.Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам (обзор) // Гидробиол. журн. — 1985. — Т. 21, № 3. — С. 70—82.
9. Михайлова Л. В. Особенности поведения водорастворимой фракции нефти в модельных опытах // Вод. ресурсы. — 1986. — № 2. — С. 125—134.
10. Никаноров А.М. Гидрохимия: Учеб. пособие. — Л.: Гидрометеоиздат, 1989. — 254 с.
11. Ратушняк А.А., Андреев М.Р., Латыпова В.З., Гарипова Л.Г. Токсическое действие нефти и продуктов ее переработки на *Dafnia magna* Straus // Гидробиол. журн. — 2000. — Т. 36, № 6. — С. 92—102.
12. Dang Z., Lock R.A.C., Flik G. Na^+/K^+ -ATP-ase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper // J. Exp. Biol. — 2000. — Vol. 203. — P. 379—387.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
14. Zanner R. Über die Wirkung von treibstoffen und Ölen auf Regenbogenforellen // Vom Wasser. — 1962. — N 29. — P. 142—177.

¹ Тернопільський національний педагогічний університет

² Інститут гідробіології НАН України, Київ

Надійшла 13.05.09