

Цветков Илья Леонидович

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ
СТРЕСС–РЕДУЦИРУЮЩЕЙ РЕАКЦИИ ГИДРОБИОНТОВ
ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ**

03.00.16 — экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва 2009

Работа выполнена на кафедре общей и биоорганической химии Ярославского государственного университета, кафедре органической и биологической химии Московского государственного педагогического университета и в лаборатории экологической биохимии Естественно–экологического института Московского государственного областного университета.

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор **Коничев Александр Сергеевич**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Микодина Екатерина Викторовна**

доктор биологических наук, с.н.с. **Топунов Алексей Фёдорович**

доктор химических наук **Мартынов Борис Иванович**

Ведущая организация: Институт биологии Карельского научного центра РАН

Защита состоится 12 ноября 2009 г. в часов на заседании Диссертационного совета Д 212.155.13 при Московском государственном областном университете по адресу: 141014, Московская обл., г. Мытищи, ул. Веры Волошиной, д. 24

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государственного областного университета по адресу: 105005, Москва, ул. Радио, д. 10а

Автореферат разослан "....." _____ 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

Т.А. Снисаренко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Техногенное загрязнение водной среды — одна из глобальных экологических проблем современного общества и в ряду с климатическими изменениями температуры, освещенности, газового, солевого состава и др. параметров, едва ли не главный по значимости средовой фактор, воздействию которого нередко подвергаются водные животные. Сила воздействия этого фактора на гидробионтов определяется его качественными и количественными признаками. Первые обусловлены вероятностью попадания в гидросферу какого-либо не встречавшегося ранее токсического вещества (некоторые тяжелые металлы, ксенобиотики и пр.), вторые — концентрацией в воде и продолжительностью воздействия на биоту. Если по силе воздействия какой-либо фактор среды выходит за привычные рамки, освоенные животными в результате естественного отбора (популяционно-генетическая адаптация) или онтогенеза (индивидуальная адаптация), организм переходит в состояние стресса — органического или физиологического расстройства, сопровождаемого нарушением обмена веществ.

Впервые понятие стресса (неспецифического адаптационного синдрома) было разработано канадским патологом Гансом Селье. Он рассматривал стресс как механизм сохранения гомеостаза, универсальный для живых организмов (Селье, 1961, 1972, 1979), однако впоследствии выяснилось, что существующее многообразие жизненных форм и уровней организации в живой природе не позволяет одинаково интерпретировать стресс у теплокровных животных и беспозвоночных организмов, таких, как насекомые или моллюски. Фундаментальные отличия в строении и функциях нервных систем, степени их вовлечённости в регуляцию гомеостаза, а также в уровнях развития и преобладании значимости клеточной и организменной регуляции метаболизма в данных примерах столь существенны, что для диагностики стресса невозможно использовать одни и те же симптомы (маркеры).

Более того, понятие стресса по-разному интерпретируется экологами, генетиками, физиологами и биохимиками в связи с существованием разных

форм проявления "органических и физиологических расстройств" у животных на метаболическом, клеточном, морфо–функциональном, популяционном и биоценотическом уровнях организации.

В этой связи важно отметить, что для универсальной диагностики стресса оказываются наиболее важными не столько какие–либо физиологические или биохимические маркеры, сколько определённый сценарий развития событий, индуктором которых в организме послужил стресс. Несмотря на различную природу стресс–индуцирующего воздействия, в нашем случае это химическая структура токсических веществ, степень их токсичности для определённых видов гидробионтов и вероятность попадания в водную среду, организм реагирует, отвечая стереотипным набором биохимических и физиологических реакций, направленных на преодоление нарушений его жизнедеятельности. Этот набор в совокупности именуемый стресс–реакцией (он же — неспецифический адаптационный синдром), обеспечивает так называемую неспецифическую или срочную адаптацию.

Срочная адаптация не является окончательной для организма, а представляет собой первую фазу индивидуальной адаптации, из которой развивается вторая фаза — устойчивая или специфическая адаптация. Её важная особенность состоит в способности, во–первых, повышать устойчивость организма к какому–либо определённому или ряду близких по своей природе раздражителей, а во–вторых, формировать так называемый структурный след, который позволяет полностью устранить нарушения гомеостаза и сохранять эту способность в постадаптационный период.

В литературе имеются многочисленные экспериментальные свидетельства того, что вследствие интоксикации у гидробионтов происходит изменение активности и состава множественных форм целого ряда ферментов, непосредственно не связанных с детоксикацией (Немова, 1996, 2008; Немова и др., 1990). Аналогичная реакция наблюдается в ответ и на другие раздражители, например, радиоактивное, рентгеновское и ультрафиолетовое облучение, повышение температуры воды. В частности, на такие факторы реагируют многие оксидоредуктазы (глюкозо–6–фосфат–, лактат–, малат–, сукцинат– и

алкогольдегидрогеназы) и трансферазы (аспартатаминотрансфераза, гексокиназа), но в гораздо большей степени это относится к ферментам с широкими метаболическими функциями — неспецифичным к субстрату гидролазам (рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, протеазы, щелочная и кислая фосфатазы, неспецифические эстеразы и др.).

По ряду признаков, это и есть "изменения обмена веществ" как указывал Г. Селье, которые составляют суть неспецифического адаптационного синдрома. Однако в силу чрезвычайной разрозненности и часто противоречивости литературных данных охарактеризовать неспецифическую адаптацию на биохимическом уровне как единый и универсальный механизм сохранения гомеостаза у гидробионтов пока не представляется возможным.

В тоже время, известны и некоторые устойчивые стресс–редуцирующие факторы специфической адаптации. Установлено, например, что большинство токсических веществ подвергается детоксикации путем их постепенной деградации системой цитохромов P₄₅₀ (органические вещества) или специфического связывания в неактивные комплексы с металлотioneинами (тяжелые металлы) или иммуноглобулинами (токсины белковой природы и другие антигены). Известны также белки теплового шока или в общем смысле — стресс–белки с невыясненными до конца функциями. Предполагают, что большинство из них играют роль специфических протекторов (например, криопротекторов), некоторые являются сигнальными в генерации стресс–редуцирующих механизмов. Кроме того, описаны белки и другие молекулярные факторы (пептиды, углеводы и их производные), участвующие в изменении проницаемости клеточных мембран, вязкости и плотности жидкостей организма и других физико–химических параметров клеток и тканей.

Очевидно, что, например, повышенное содержание в организме определённых металлотioneинов или иммуноглобулинов, накопление криопротекторов, индукция активности "адаптационных" форм ферментов и др. параметры, выходящие за рамки нормы реакции, являются вполне убедительными признаками структурного следа специфической адаптации. Тем

не менее, механизмы координации срочных и возникающих позднее устойчивых стресс–редуцирующих факторов, собственно процесс индукции специфической адаптации как результат стресс–реакции на токсическое воздействие остаются пока не известными.

По нашему убеждению, для разрешения проблем экологической биохимии в области теории адаптации необходим систематический подход к исследованию, а именно, анализ динамики изменений широкого круга метаболических параметров (прежде всего, активности ферментов) у ряда гидробионтов разных систематических групп в ответ на токсическое воздействие различной природы, и интерпретация полученных результатов в концепции неспецифической адаптации. Одновременно детальное изучение физико–химических свойств ферментов позволит определить их участие в адаптации как специфических стресс–редуцирующих факторов и таким образом расшифровать механизмы стресс–реакции и адаптации.

Цель и задачи исследования. Основная цель нашей работы — выявление биохимических механизмов стресс–редуцирующей реакции на сублетальную интоксикацию у пресноводных моллюсков и других гидробионтов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить основные параметры гидролитических ферментов (активность, тканевую локализацию, состав множественных форм) у пресноводных гидробионтов в норме и выявить их динамику в ответ на слабое токсическое воздействие (на уровне ПДК) в остром опыте.

2. Охарактеризовать универсальные и специфичные аспекты биохимической адаптации в ответ на токсическую нагрузку у разных видов гидробионтов.

3. Выявить механизм стресс–редуцирующей реакции на сублетальное токсическое воздействие и охарактеризовать взаимосвязь биохимических механизмов срочной и устойчивой адаптации у пресноводного моллюска живородка речная (*Viviparus viviparus* L.).

4. Оценить и обосновать возможность биотестирования и биоиндикации с использованием активности гидролитических ферментов гидробионтов как маркеров токсического загрязнения воды и водоёмов.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые охарактеризован механизм метаболической адаптации к токсическому воздействию у живородки речной, включая фазы неспецифической (срочной) и специфической (устойчивой) адаптации, а также процесс их координации с участием комплекса кислых фосфатаз, обладающих различной специфичностью в отношении природных субстратов.

Проанализированы и обобщены изменения ряда физико–химических параметров гидролитических ферментов (общая активность фермента, состав и активность множественных форм) у широкого круга видов пресноводных гидробионтов в ответ на слабое токсическое воздействие. Впервые получены систематические данные о динамике биохимической адаптации у разных видов исследованных животных, которые дополняют классическое представление о неспецифическом адаптационном синдроме (НАС). Эти данные позволяют выявить как индивидуальные особенности разных видов по их стресс–реакции, так и общие (универсальные) закономерности адаптивной динамики метаболизма.

Впервые выделены и охарактеризованы кислые фосфатазы из пищеварительной железы моллюска живородка речная (*Viviparus viviparus* L.). Определены их физико–химические и функциональные параметры (R_f в 5,7% ПААГ, pI , субстратная специфичность), установлена субклеточная локализация и тканеспецифичность этих ферментов. Кроме того, выделена и подробно изучена индуцибельная (адаптационная) кислая фосфатаза, появляющаяся в ответ на острую интоксикацию хлоридом кадмия.

На основании данных о субстратной специфичности и изменении активности кислых фосфатаз при интоксикации предложена схема участия этих ферментов в адаптивной регуляции гликолиза и накоплении побочных метаболитов (глюкоза, фруктоза, сорбит, глицерин) у пресноводных гидробионтов.

Установлена роль сорбита в метаболизме живородки речной как криопротектора и фактора устойчивости к токсическому воздействию. Предполагается участие сорбита в индукции апоптоза при исчерпании адаптивного потенциала отдельных клеток. Выявлена динамика содержания сорбита и активности ряда ферментов углеводного обмена в пищеварительной железе моллюска. Показано, что сорбит накапливается в пищеварительной железе моллюска, как при понижении температуры воды, так и острой интоксикации, однако происходит это разными путями, поскольку динамика сопутствующих накоплению сорбита ферментов (кислая фосфатаза, сорбитолдегидрогеназа, альдозоредуктаза) различается в зависимости от характера стресс–индуцирующего воздействия. Это связано с вынужденной оптимизацией регуляторных механизмов в процессе адаптации к определённым неблагоприятным факторам внешней среды и/или необходимостью изменения баланса свободных углеводов (прежде всего, глюкозы и фруктозы) как предшественников сорбита для реализации стресс–редуцирующих реакций организма.

На примере трёх видов моллюсков *Viviparus viviparus* L., *Anodonta stagnalis* Gmelin, *Unio longirostris* Rossmassler показана изменчивость активности кислой фосфатазы в популяциях живородки речной, обитающих в зонах с различной антропогенной нагрузкой (р. Которосль, г. Ярославль и Ярославская обл.). Исследованы активность и состав множественных форм кислой фосфатазы. Установлены достоверные и очень значительные популяционные различия исследованных биохимических параметров, сохраняющиеся в условиях кратковременного изменения условий обитания (при искусственном переселении).

На основании анализа результатов лабораторных исследований даны обоснованные рекомендации для выбора тест–функции (фермент), тест–объекта (вид животного) и параметров токсикологического эксперимента (продолжительность, концентрация токсиканта). Наглядно продемонстрирован способ биохимического тестирования качества воды в остром опыте с

использованием живородки речной (тест–объект) и гидролитических ферментов (тест–функция).

Практическая значимость. Запатентованный нами способ биохимического тестирования качества воды (патент РФ №2308719) состоит в регистрации изменений суммарной активности кислой фосфатазы и дезоксирибонуклеазы в экстракте пищеварительной железы живородки речной по истечении ряда кратковременных экспозиций моллюсков в тестируемой воде. Этот способ имеет универсальное применение в отношении химической природы токсических веществ и их качественного состава в многокомпонентных смесях, т.к. базируется на концепции о неспецифическом адаптационном синдроме, являющейся частью нашего исследования.

Предложен способ биохимической индикации токсического загрязнения природных водоёмов по сравнительным данным о суммарной активности кислой фосфатазы в экстракте пищеварительной железы трёх видов пресноводных моллюсков (*V. viviparus*, *A. stagnalis*, *U. longirostris*). По сравнению с традиционными методами биологической индикации, данный способ значительно проще для реализации, т.к. не требует глубоких знаний в области морфологии и систематике водных животных. В тоже время он позволяет оценить суммарное токсическое загрязнение водоёма или его определённых зон, и, по сути, не ограничен в применении ареалами изученных видов моллюсков, т.к. может быть отработан и для других видов гидробионтов.

Обоснованность научных положений, выводов, рекомендаций. Научные положения диссертационной работы, выводы и рекомендации являются результатом натурных и лабораторных исследований, проведённых с применением современных биологических, биохимических и физико–химических методов анализа с использованием калиброванной, юстированной и поверенной аппаратуры. Для получения экспериментальных результатов в основном использованы стандартные методы исследований. Корректность полученных результатов подтверждена статистической оценкой сходства и различия выборок при повторных экспериментах и проведении независимых контрольных исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. В ответ на сублетальное токсическое воздействие (на уровне ПДК) активность окислительно–восстановительных и гидролитических ферментов у водных животных меняется циклически, характеризуясь закономерно повторяющимися фазами частичной инактивации и последующей активации через определенные промежутки времени. Эта зависимость представляет собой отражение срочной биохимической адаптации организма к токсическому воздействию, которая, реализуясь на физиологическом уровне, формирует неспецифический адаптационный синдром.

2. У водных животных, разных по уровню биологической организации, существуют универсальные факторы метаболической адаптации к токсическим веществам, которые не зависят от природы токсиканта. Эти факторы обусловлены активностью ферментных систем, напрямую не связанных с детоксикацией, но участвующих в стресс–редуцирующей регуляции обмена веществ и индукции специфических факторов токсикорезистентности. Эти процессы реализуются с помощью множественных форм ферментов, метаболические функции которых могут принципиально отличаться друг от друга, что позволяет производить устойчивые сдвиги обмена веществ (на примере комплекса кислых фосфатаз и их влияния на интенсивность гликолиза и накопление побочных метаболитов).

3. Представления о динамике активности ферментов, участвующих в неспецифической адаптации к токсическому воздействию, могут быть использованы для разработки методов биохимического тестирования и биохимической индикации качества природных и сточных вод.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались I Международной и IV Всероссийской научно–практической конференции "Экология и охрана окружающей среды" (Рязань, 15–16 сентября 1994 г.), VII Съезду Гидробиологического общества РАН (Казань, 14–15 октября 1996 г.), научной конференции "Вузовская наука в решении экологических проблем Верхне–Волжского региона" (Ярославль, 18–19 апреля 1996 г.), научной конференции "Биологические исследования в Ярославском

государственном университете" (Ярославль, 29 ноября 1997 г.), X Международной научной конференции "Эколого–биологические проблемы бассейна Каспийского моря и водоемов внутреннего стока Евразии" (Астрахань, 25–30 апреля 2008 г.), Международной научно–практической конференции "Актуальные проблемы биоэкологии" (Московский областной государственный университет, 21–24 октября 2008 г.), III Всероссийской конференции по водной токсикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, "Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы" (Борок, 11–16 ноября 2008 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 работ, из них 10 статей в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ (1 — в печати), 1 монография, 1 патент на изобретение, 1 рукопись, депонированная в ВИНТИ, 11 статей в материалах международных, всероссийских и др. конференций, 3 статьи в сборниках трудов вузов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, отражающего современные представления о биохимических механизмах адаптации к токсическому воздействию *in vivo* у гидробионтов, участии различных белков, ферментов и метаболитов в разнообразных молекулярных процессах формирования токсикорезистентности на уровне организма (глава 1); описания биологических объектов, материалов и методов исследования (глава 2); изложения и обсуждения собственных экспериментальных данных (главы 3–7); заключения, выводов и списка цитированной литературы. Диссертация изложена на 382 страницах, содержит 64 таблицы и 52 рисунка, включая диаграммы, графики и фотографии.

Личный вклад автора. Автором сформулированы цель и задачи исследований, теоретически обоснованы пути их решения, подобраны наиболее оптимальные методы анализа. Результаты исследований получены автором лично, за исключением случаев специально оговоренных в диссертации и автореферате, когда результаты были получены в соавторстве с другими исследователями, о чём имеются ссылки на совместные публикации. Работа написана автором единолично.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования. В работе использовано 15 видов пресноводных гидробионтов разных систематических групп: моллюски — катушка роговидная (*Planorbarius corneus* L.: Bulinidae, Hygrophila, Gastropoda, Mollusca), битиния Трошеля (*Bithynia troscheli* Paasch: Bithyniidae, Discopoda, Gastropoda, Mollusca), живородка речная (*Viviparus viviparus* L.: Viviparidae, Architaenioglossa, Gastropoda, Mollusca), беззубка обыкновенная (*Anodonta stagnalis* Gmelin, Unionidae, Actinodontida, Bivalvia, Mollusca), перловица (*Unio longirostris* Rossmäessler, по последним источникам — *Unio rostratus* Lam.: Unionidae, Actinodontida, Bivalvia, Mollusca), дрейссена речная или мидия–зебра (*Dreissena polymorpha* Pallas: Dreissenidae, Veneridita, Bivalvia, Mollusca), членистоногие — дафния "водяная блоха" (*Daphnia magna* Straus: Daphniidae, Anomopoda, Branchiopoda, Arthropoda), кольчатые черви — улитковая пиявка *Glossiphonia complanata* L.: Glossiphoniidae, Rhynchobdellida, Clitellata, Annelida), лимнодрил Гоффмейстера (*Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède: Tubificidae, Haplotaxida, Clitellata, Annelida) и трубочник (*Tubifex newaensis* Michaelsen: Tubificidae, Haplotaxida, Clitellata, Annelida), рыбы — белый толстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes: Cyprinidae, Cypriniformes, Osteichthyes, Chordata), плотва обыкновенная (*Rutilus rutilus* L.: Cyprinidae, Cypriniformes, Osteichthyes, Chordata) и ротан–головешка (*Percottus glehni* Dybowski: Odontobutidae, Perciformes, Osteichthyes, Chordata).

Некоторых животных содержали в лаборатории в виде постоянной самовоспроизводящейся культуры (дафния, катушка роговидная; возраст дифференцировали по размеру особей) или получали на опытной биологической станции (белый толстолобик, сеголетки одного помёта, 12–15 см длины), остальных самостоятельно собирали в природных водоемах (г. Ярославль, Ярославская обл., Московская обл.), а затем акклимировали к лабораторным условиям от 2 недель до 2 месяцев в специально созданных микрокосмах (аквариумах, которые заселяли высшие растения, бентос и планктон, характерные для мест обитания подопытных животных) при температуре 15–17°C, освещении естественным светом и с круглосуточной

12

аэрацией воды. В отдельных случаях, при проведении натурных испытаний (биохимическая индикация загрязнений, сезонная динамика показателей), животных препарировали немедленно после доставки в лабораторию.

Лабораторные токсикологические эксперименты производили на группах животных (от 5 до нескольких десятков особей в зависимости от размера), содержащихся в растворе токсического вещества (хлориды кадмия (II), меди (II), цинка (II), *бис*–(трибутилолово)оксид, никлосамид (4–нитро–2–хлоранилид–5–хлорсалицилат этаноламина), приготовленном на аквариумной воде в конечной концентрации 0,1–10 величин предельно допустимой концентрации для водоемов рыбохозяйственного назначения (ПДК_{водн.}). В особых случаях (пример биохимического тестирования качества воды) использовали серию разбавлений сточной воды химического производства (отобрана из ливнёвой канализации предприятия "Лакокраска", г. Ярославль). Контрольной группой служили животные, содержащиеся в чистой аквариумной воде и прочих равных условиях. Экспозиция (продолжительность) эксперимента в разных случаях составляла от 1–2 часов до нескольких суток. В эксперименте с пониженной температурой воды опытную группу животных помещали в холодильную камеру с постоянной температурой 4–6°C, контрольную группу содержали при нормальной температуре (15–17°C). В экспериментах с искусственным переселением подопытных животных (живородка речная) помещали в придонные садки со свободным обменом воды, доступом к планктону и мелкому бентосу. С помощью таких садков группы особей, собранных на относительно чистом участке, экспонировали на загрязненном участке того же водоёма (р. Которосль, г. Ярославль) и наоборот. Экспозиция составляла 7 суток, контролем служили группы особей, помещенные в садки, но собранные на том же участке водоёма, где они были экспонированы.

Основные методы исследования. Для биохимического анализа из тел исследуемых животных (дафнии, черви, мелкие моллюски — битиния и катушка) или их отдельных органов (крупные моллюски, рыбы) готовили экстракты водорастворимых белков путем гомогенизации в фарфоровых

ступках на холоду с пятикратным объёмом 0,15 М NaCl (в некоторых случаях с добавлением 0,5% тритона X-100) и последующего центрифугирования при 10000 g и 4°C в течение 10–20 мин. Хранили экстракты в замороженном виде или при –18°C в присутствии 50% глицерина (для выявления дегидрогеназ). В полученных экстрактах определяли содержание белка по методу Лоури или Бредфорд и активность ферментов: глюкозо–6–фосфат–, глицеральдегид–3–фосфат–, алкоголь–, лактат–, малат–, сукцинат–, сорбитолдегидрогеназы, альдозоредуктазы, кислой и щелочной фосфатазы, неспецифической эстеразы, рибо– и дезоксирибонуклеазы, кислой протеиназы. Суммарную активность ферментов выявляли спектрофотометрически и выражали в единицах удельной активности — Е/мг белка. Изменение ферментативной активности у опытных животных оценивали по отношению к контрольным и выражали в процентах. Качественный состав множественных форм ферментов (гидролазы) определяли методом электрофореза в 7,2–5,7% ПААГ по Девису с окрашиванием продукта или субстрата ферментативной реакции (негативное окрашивание, применялось для ДНКазы, РНКазы, кислой протеиназы). Индивидуальную активность множественных форм определяли путём денситометрии полученных энзимограмм и выражали в процентах от суммарной активности фермента.

Для субклеточного фракционирования экстракты тканей готовили по специальному протоколу в растворе сахарозы с помощью гомогенизатора Поттера–Эльвейгейма, фракционирование производили путём дифференциального центрифугирования с очисткой лёгких фракций в ступенчатом градиенте сахарозы. Чистоту полученных фракций оценивали с помощью анализа ферментов–маркеров субклеточных структур. Последующую очистку ферментов производили методом препаративного изоэлектрофокусирования.

Качественный состав полиолов в экстрактах тканей выявляли методом ВЭЖХ в ион–эксклюзионном варианте с рефрактометрическим детектированием. Содержание сорбита определяли ферментативным методом с очищенным препаратом сорбитолдегидрогеназы из печени овцы.

Все измерения производили в 3–6 повторностях, статистическую достоверность результатов оценивали с вероятностью 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы мы систематически исследовали реакцию ферментных систем разных видов гидробионтов на острое токсическое воздействие разной интенсивности и продолжительности. Для этого использовали всё разнообразие подопытных животных и токсических веществ, которым располагали. У дегидрогеназ исследовали суммарную активность, у гидролаз — суммарную активность и состав множественных форм. Обобщив полученные результаты, теоретически обосновали возможность маркировать токсическое загрязнение воды с помощью ферментов и сформулировали основные рекомендации по планированию токсикологических экспериментов. На следующем этапе разработали и произвели апробацию по одному из возможных примеров биохимического теста и биохимической индикации качества воды (с использованием кислой фосфатазы трёх видов пресноводных моллюсков). Параллельно мы подробно, на уровне изолированных препаратов исследовали комплекс кислых фосфатаз живородки речной с целью установить взаимосвязь изменений их активности со стрессовым состоянием и адаптацией, индуцированными токсическим воздействием. Наконец, в заключении работы проанализировали динамику побочных метаболитов (глюкоза, фруктоза, сорбит) и активности сопутствующих их накоплению ферментов живородки речной (некоторые кислые фосфатазы, сорбитолдегидрогеназа и альдозоредуктаза) для более глубокого изучения биохимических механизмов адаптации у гидробионтов.

Суммарная активность ферментов в остром токсикологическом эксперименте. Динамика ферментов, наблюдавшаяся нами при интоксикации гидробионтов, представлена на рис. 1–4.

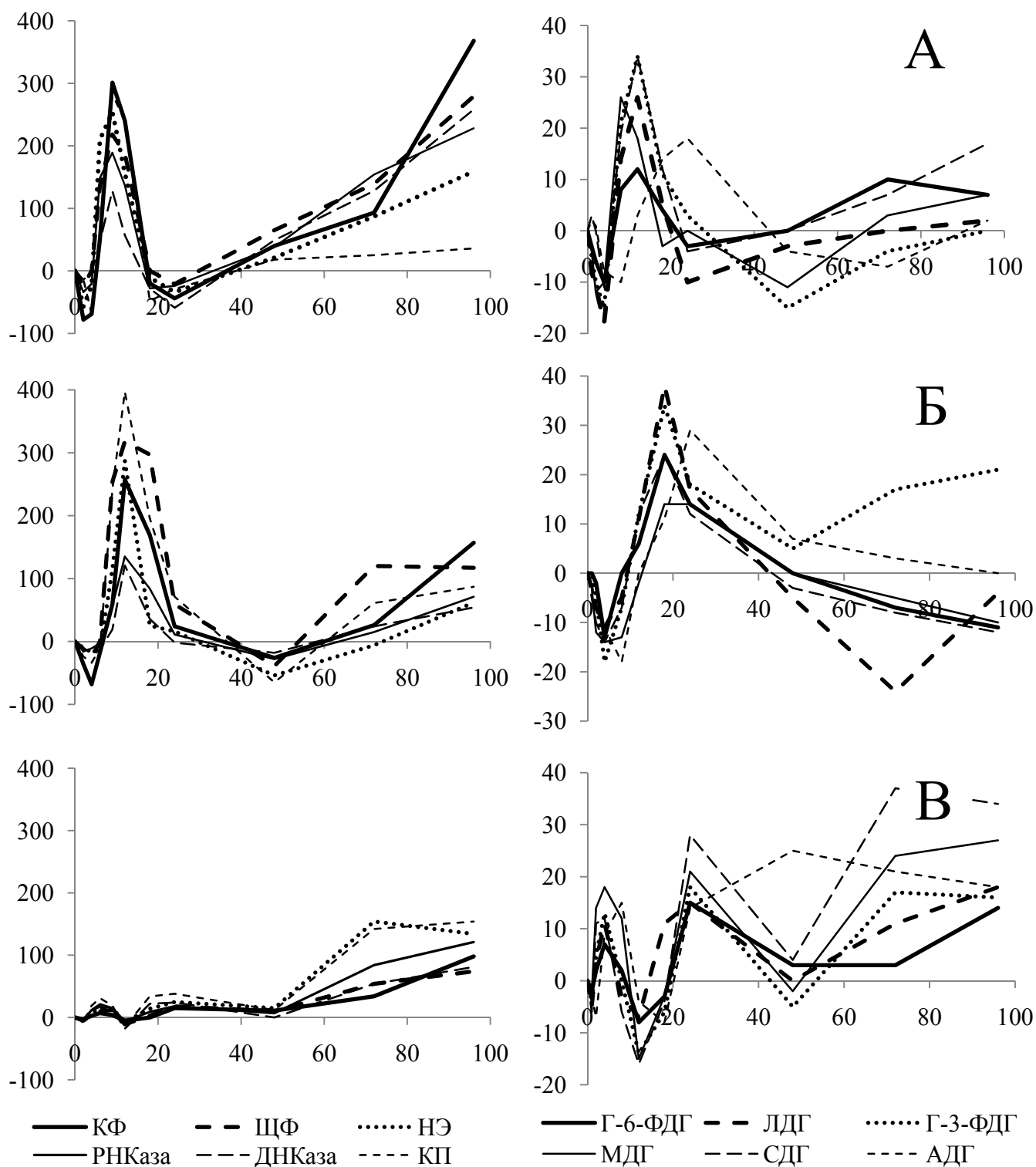


Рис. 1. Динамика активности ферментов у разных гидробионтов при токсическом воздействии хлорида кадмия (0,005 мг Cd²⁺/л — ПДК_{водн.}). По оси абсцисс — экспозиция опыта, ч; по оси ординат — отклонение активности от контроля, %. Условные обозначения: А — трубочник, Б — катушка роговидная, В — белый толстолобик; КФ — кислая фосфатаза, ЩФ — щелочная фосфатаза, НЭ — неспецифическая эстераза, РНККаза — рибонуклеаза, ДНККаза — дезоксирибонуклеаза, КП — кислая протеиназа, Г-6-ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, Г-3-ФДГ — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, МДГ — малатдегидрогеназа, СДГ — сукцинатдегидрогеназа, АДГ — алкогольдегидрогеназа.

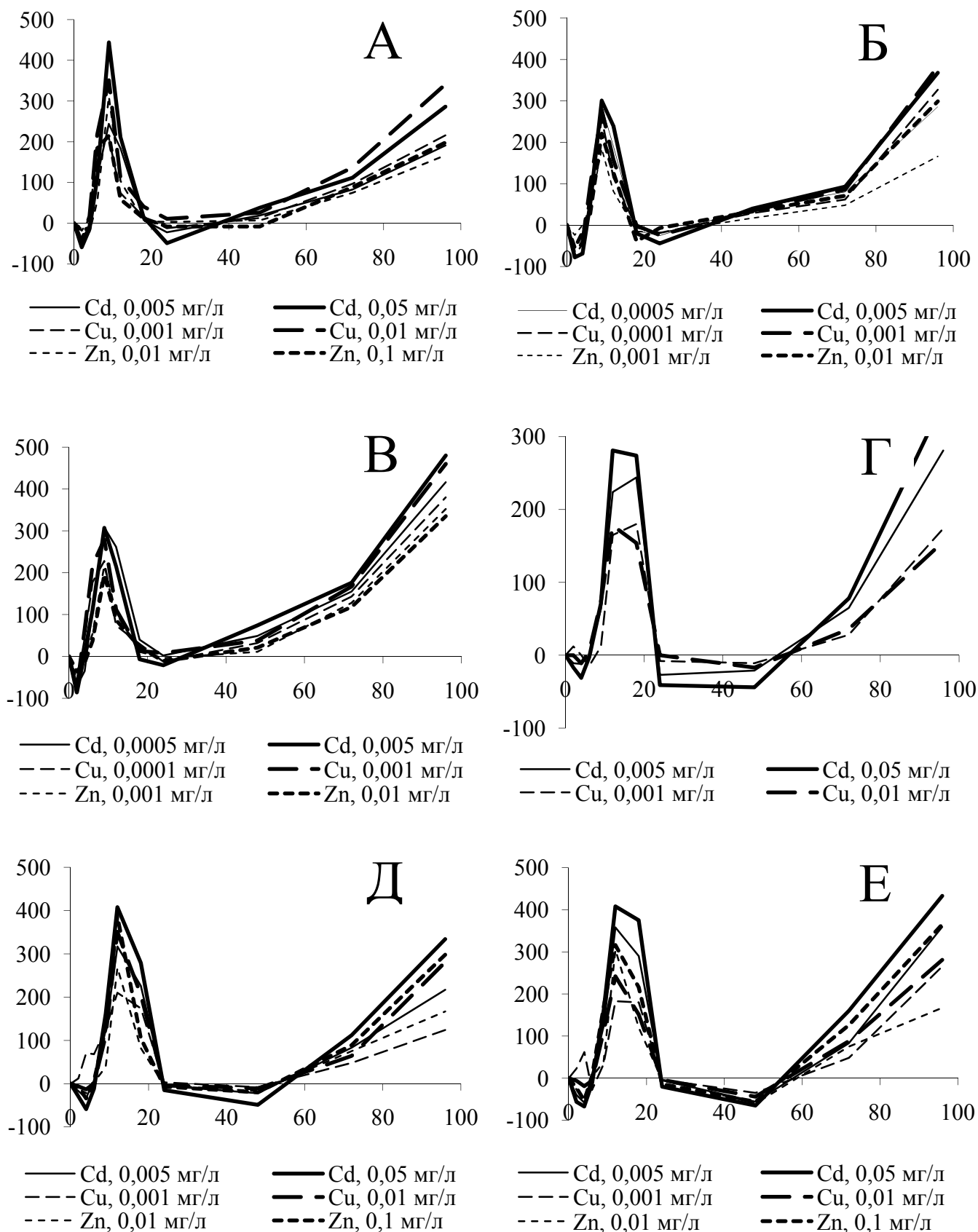


Рис. 2. Динамика суммарной активности кислой фосфатазы беспозвоночных гидробионтов при интоксикации тяжелыми металлами (хлориды, концентрация указана для катиона металла). По оси абсцисс — экспозиция опыта, ч; по оси ординат — отклонение активности от контроля, %. Условные обозначения: А — улитковая пиявка, Б — трубочник, В — лимнодрилл Гоффмейстера, Г — перловица, Д — беззубка обыкновенная, Е — живородка речная.

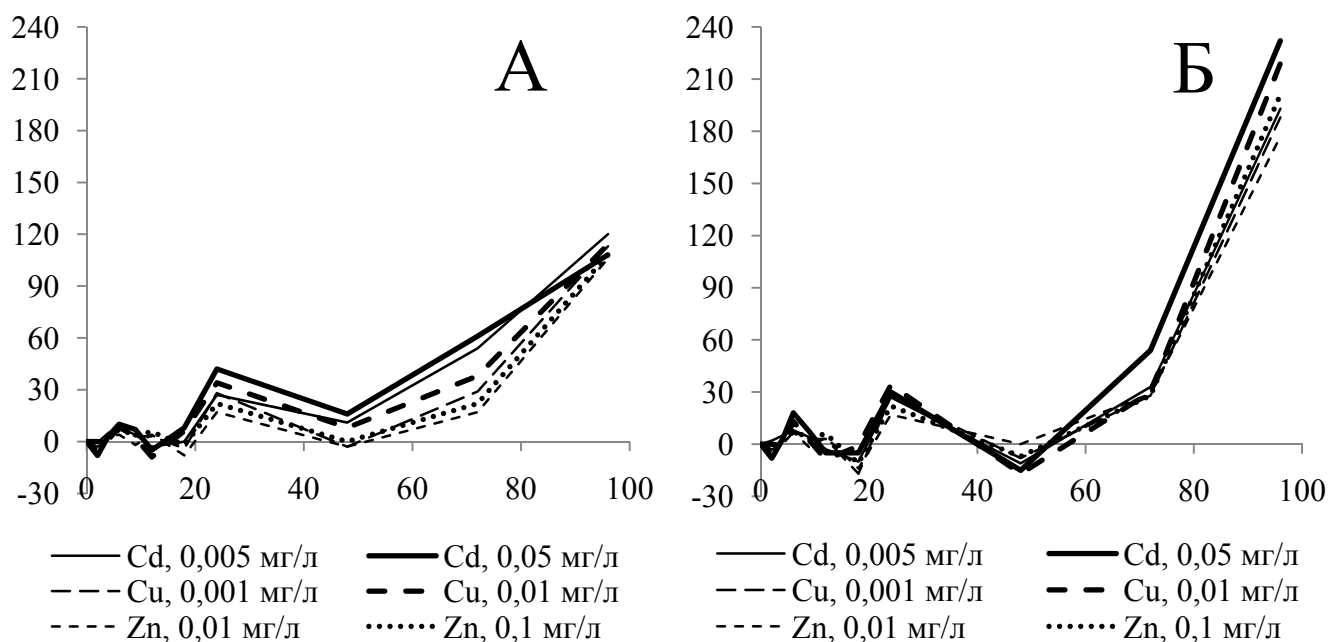


Рис. 3. Динамика суммарной активности кислой фосфатазы рыб при интоксикации тяжелыми металлами (хлориды, концентрация указана для катиона металла). По оси абсцисс — экспозиция опыта, ч; по оси ординат — отклонение активности от контроля, %. Условные обозначения: А — плотва обыкновенная, Б — ротан-головешка.

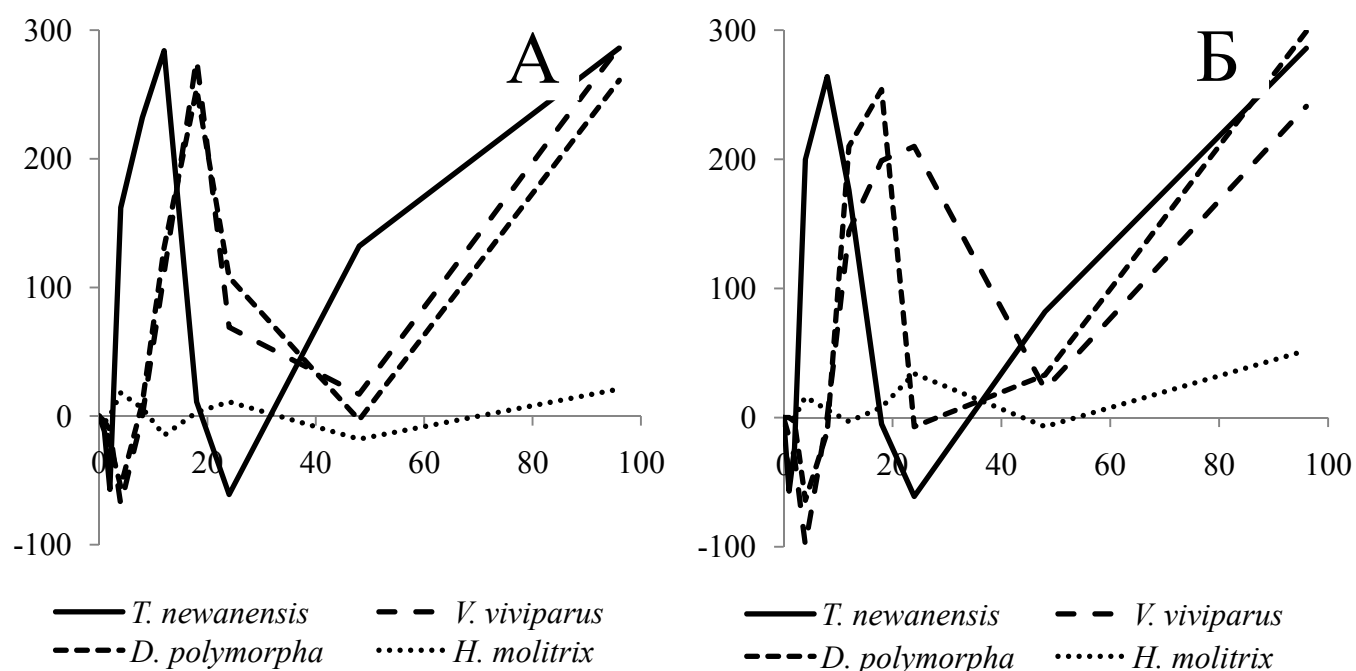


Рис. 4. Динамика активности кислой фосфатазы при интоксикации гидробионтов пестицидами. По оси абсцисс — экспозиция опыта, ч; по оси ординат — отклонение активности от контроля, %. Условные обозначения: А — бис-(трибутилового)оксид (0,0001 мг/л), Б — никлосамид (0,005 мг/л).

Проанализировав и обобщив полученные данные мы пришли к выводу, что циклические изменения ферментативной активности, наблюдаемые в ответ на слабое (сублетальное) токсическое воздействие, не зависят от химической природы токсиканта, метаболической роли исследуемых ферментов и в целом от уровня организации гидробионтов, причём, временная динамика этих изменений имеет строго определенную форму фазной кривой (в координатах: экспозиция опыта — отклонение активности ферментов от контроля), которая, подобно классической кривой адаптации Г. Сельё, образована несколькими последовательными стадиями (реакция тревоги, стадия сопротивляемости и стадия истощения), однако, принципиально отличается от неё своей цикличностью. В частности, "стадия истощения" по Сельё необратима и является предвестником гибели животного вследствие повреждений, несовместимых с жизнью, или истощения необходимых для адаптации ресурсов, а на уровне метаболизма, по нашим данным, её сменяет повторная активация ферментов и новая фаза биохимической адаптации. Стадия второй индукции активности ферментов более продолжительна, чем первая и наблюдается у кольчатых червей и моллюсков вплоть до окончания острого опыта (96 ч). У рыб цикличность биохимической адаптации выражена ещё более отчётливо: за время эксперимента у них насчитывается до трёх фаз угнетения и индукции активности ферментов, последовательно сменяющих друг друга.

Таким образом, выявленная нами кривая биохимической адаптации отражает процесс стресс-индуцированной оптимизации метаболизма, состоящей в колебательной динамике биохимических функций за пределами нормы реакции (об этом свидетельствуют существенные отличия от контрольных значений, которые в течение экспозиции также претерпевали некоторые колебания) и, по ряду признаков, соответствует фазе срочной (неспецифической) адаптации гидробионтов к токсическому воздействию.

Следует отметить, что колебательные изменения активности ферментов несколько отличаются по продолжительности отдельных фаз у гидробионтов

разных систематических групп. У моллюсков первое снижение активности ферментов ("реакцию тревоги") мы наблюдали, как правило, через 4 часа экспозиции, увеличение активности до максимума — через 12 часов, повторное снижение — через 24–48 часов. У кольчатых червей те же фазы отмечены в более ранние сроки — через 2, 8–9 и 18–24 часа, а у рыб — через 2, 6, 12–18 часов, соответственно. Вероятно, частота адаптивных колебаний активности ферментов определяется динамическими процессами в организме, различными в зависимости от биологической организации видов животных, и этот фактор обязательно следует учитывать при постановке токсикологических экспериментов, а точнее, выборе экспозиции острых опытов. Наша практика показала, что если продолжительность биохимического теста не является обязательным его условием, следует остановиться на 96 часах, когда прирост активности ферментов довольно сильно развернут во времени и наблюдается у всех исследованных видов. В тоже время для экспресс-теста больше подойдет ряд экспозиций в пределах 1–6 часов, когда в ответ на интоксикацию следует "реакция тревоги" и единообразное снижение активности ферментов.

Наконец, анализ кривых ферментативной активности у разных видов животных позволил выделить два способа биохимической адаптации, которые симптоматически отличаются максимальной величиной наблюдаемых изменений активности ферментов. Первый способ (токсикодинамичность) свойственен кольчатым червям и моллюскам и характеризуется очень высокими значениями прироста и снижения активности ферментов относительно контроля (особенно гидролаз — до 300%), второй способ (гомеостатичность), характерный для рыб, напротив, отличается слабо выраженной динамикой ферментных систем, хотя достоверные колебания активности, тем не менее, имеют место. "Предпочтение" того или иного способа обусловлено уровнем организации исследованных видов гидробионтов, а именно, степенью развития у них систем детоксикации тканей и органов (например, кровь, печень, почки у рыб), и как следствие — возможностью поддержания гомеостаза на уровне не только отдельных клеток,

но и целого организма, а также возможным преобладанием поведенческой формы адаптации у животных, которые способны активно избегать локальных загрязнений водоёма (рыбы). В последнем случае биохимические факторы адаптации становятся не востребуемыми и, как следствие, слабо развитыми.

В этой связи необходимо подчеркнуть, что рыбы не могут служить тест-объектами для прикладных токсикологических экспериментов, поскольку кроме неудобств их содержания в лаборатории могут возникнуть трудности с выявлением динамики активности тест-ферментов, в отличие от малоподвижных или неподвижных беспозвоночных гидробионтов.

Изменение состава множественных форм ферментов при интоксикации гидробионтов. Близкие по своей биохимической функции, но отличающиеся по физико-химическим параметрам ферменты, так называемые "множественные формы", как принято считать, обуславливают метаболическую дифференцировку субклеточных органелл, клеток тканей и органов (Мецлер, 1980; Райдер, Тейлор, 1983). Но в тоже время такие ферменты являются важными элементами регуляции клеточного гомеостаза и биохимической адаптации к воздействию внешних факторов. В частности, в литературе имеется ряд сообщений об изменении качественного состава множественных форм ферментов в ответ на воздействие токсических веществ и других стресс-индуцирующих факторов. Изменения эти, как правило, состоят в трудно предсказуемой реакции отдельных форм, некоторые из них частично или полностью инактивируются, другие — активируются, или индуцируются вновь, активность третьих практически не меняется. Мы в свою очередь также исследовали этот феномен на примере ряда гидролитических ферментов (здесь иллюстрации приводятся частично, полные сведения содержатся в рукописи диссертации) при интоксикации гидробионтов солями тяжёлых металлов с экспозицией 96 часов (рис. 5).

Полученные данные свидетельствуют о существенном изменении состава множественных форм некоторых ферментов под влиянием токсикантов. Особого внимания заслуживает появление новых форм ферментов, которые

можно назвать "адаптоферментами", поскольку их появление индуцировано токсическим воздействием.

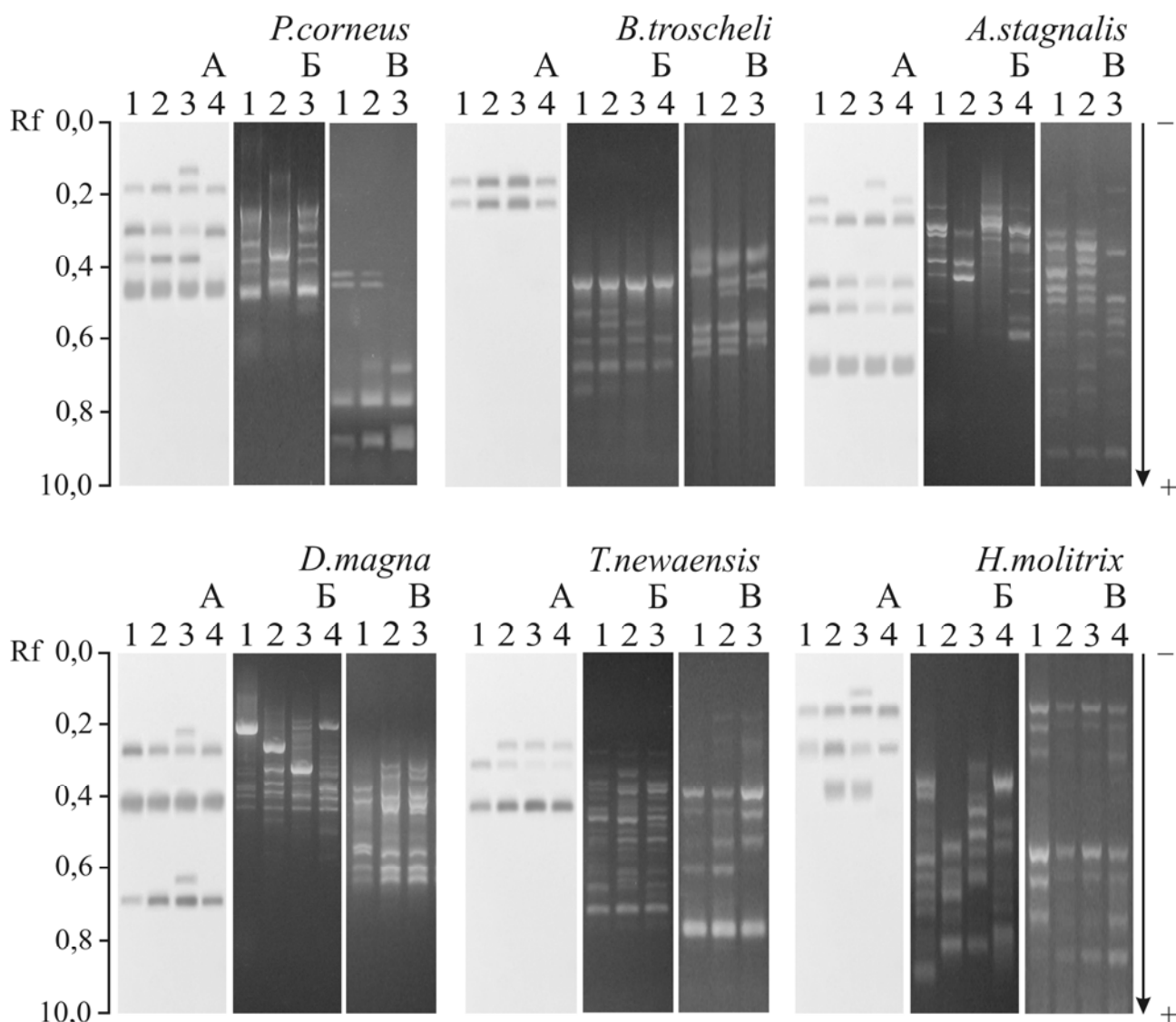


Рис. 5. Электрофореграммы множественных форм ферментов гидробионтов в норме и при интоксикации тяжёлыми металлами (хлориды) с экспозицией 96 ч. Условные обозначения: А — кислая фосфатаза, Б — дезоксирибонуклеаза, В — кислая протеаза; 1 — контроль, 2 — воздействие 0,05 мг Cd^{2+} /л (для *T. newaensis* — 0,005 мг Cd^{2+} /л), 3 — воздействие 0,01 мг Cu^{2+} /л (для *T. newaensis* — 0,001 мг Cu^{2+} /л), 4 — воздействие 0,01 мг Cu^{2+} /л (для *T. newaensis* — 0,01 мг Zn^{2+} /л); стрелка — направление электрофореза (от катода к аноду).

Следует также отметить, что суммарная активность множественных форм у всех исследованных ферментов значительно повышалась у всех представленных здесь гидробионтов (через 96 ч в условиях произведенного острого опыта — см. предыдущий раздел "Суммарная активность ферментов в остром токсикологическом эксперименте"), в тоже время индивидуальная

активность множественных форм меняется разнонаправлено. Особенно хорошо это заметно у дезоксирибонуклеаз и кислых протеаз, которые к тому же отличаются наибольшим числом выявленных множественных форм (см. рис. 5).

Уточним кстати, что обнаруженные на электрофореграммах зоны активности ферментов далеко не во всех случаях являются их "множественными формами" и вообще родственными ферментами — компонентами одного функционального комплекса. В частности, существует целый ряд ферментов, разрушающих белок (например, БСА), это и неспецифические экзопептидазы, специфические и неспецифические эндопептидазы (протеиназы), наконец, вполне определённые пищеварительные ферменты, такие как пепсин и трипсин. Эти ферменты могут быть выявлены на электрофореграмме с одним и тем же субстратом (также как при определении их суммарной активности), но в этом случае использование термина "множественные формы фермента" скорее всего, будет не вполне корректно, а значит и стресс-редуцирующую реакцию отдельных протеаз следует рассматривать как настройку целого ряда метаболических превращений, охватывающих субклеточное "пищеварение", защиту от патогенных белков, реализацию механизма автолиза клеток, распад эндогенных белков, влияние на проницаемость субклеточных мембран и т.д.

Всё вышесказанное определённым образом касается и дезоксирибонуклеаз, среди которых у живородки речной нам удалось выявить ферменты, близкие по описанию с эндонуклеазой, фрагментирующей геномную ДНК при апоптозе, а также ДНКазы, обладающие бóльшим сродством к экзогенной ДНК и являющиеся, скорее всего, пищеварительными ферментами (данные получены и опубликованы совместно с А.П. Поповым и А.С. Коничевым).

По этим причинам столь разноплановая реакция протеаз и ДНКаз, приведённых здесь для примера, не может подлежать строгому анализу в свете биохимической адаптации. Для этого необходима информация о метаболической функции каждой из выявленных "множественных форм", или

точнее ферментов с гидролитической активностью в отношении сходных субстратов, что позволит систематизировать и группировать выявленные ферменты и уже тогда только строить обоснованные предположения об участии в неспецифической или специфической адаптации.

В этом отношении кислые фосфатазы — значительно более удобный объект исследования. Во-первых, характерным признаком кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) является гидролитическая активность в отношении синтетического субстрата (не имеющего природных аналогов), такого как *p*-нитрофенилфосфат или α -нафтилфосфат в среде с кислым pH, и по этому признаку кислые фосфатазы легко дифференцировать от других ферментов. Во-вторых, кислые фосфатазы у большинства гидробионтов представлены значительно меньшим числом множественных форм, что упрощает процедуру их очистки до гомогенного состояния. И в третьих, по нашим многочисленным наблюдениям, реакции кислых фосфатаз на интоксикацию не менее разнообразны, чем у протеаз и ДНКаз (см. рис. 5), что позволяет предположить их активное участие в биохимической адаптации гидробионтов к токсическому воздействию.

Комплекс кислых фосфатаз живородки речной. В пищеварительной железе живородки речной в норме нами выявлено пять белков с активностью кислой фосфатазы, обозначенных нами КФ1–КФ5 в соответствии с их анодной подвижностью. Интоксикация хлоридом кадмия ($0,01 \text{ мг Cd}^{2+}/\text{л}$, 72 ч.) приводит к индукции активности ещё одной формы фермента с наименьшей электрофоретической подвижностью — КФ6 (рис. 6).

Анализ субклеточной локализации кислых фосфатаз, проведённый нами методом дифференциального ультрацентрифугирования, позволил установить, что значительная ферментативная активность присутствует только в экстрактах лизосом и в цитозоле, причём ферменты этих фракций представлены формами КФ4–КФ6 и КФ1–КФ3, соответственно, значительно отличающимися величиной ферментативной активности.

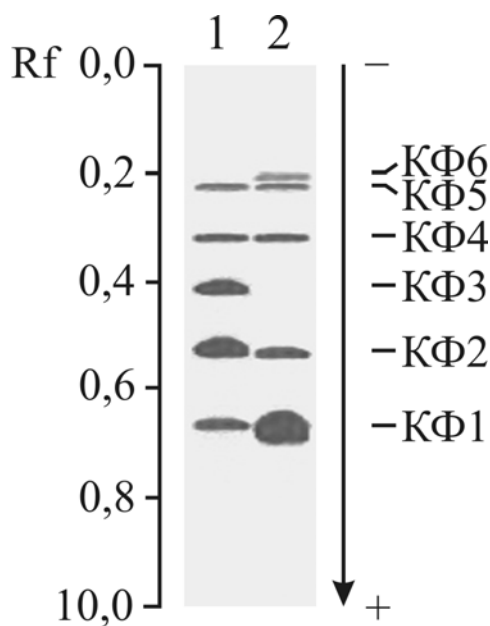


Рис. 6. Электрофреграмма комплекса кислых фосфатаз пищеварительной железы живородки речной в норме и при интоксикации. Условные обозначения: 1 — контроль, 2 — воздействие хлорида кадмия (0,01 мг Cd^{2+} /л, 72 ч); КФ1–КФ6 — зоны активности исследуемого фермента; стрелка — направление электрофореза (от катода к аноду).

Дальнейшая очистка ферментов путем препаративного изоэлектрофокусирования сначала в широком, а затем в узких диапазонах pH позволила получить препараты индивидуальных кислых фосфатаз, которые характеризовались единственной зоной активности на электрофреграмме с постоянной величиной R_f , и другими индивидуальными физико–химическими характеристиками (табл. 1).

Таблица 1. Физико–химические характеристики кислых фосфатаз из пищеварительной железы живородки речной

Форма фермента	Субклеточная локализация	R_f в 5,7% ПААГ	pI	Активность по p–нитрофенилфосфату, Е/мг белка	
				в исходном гомогенате	после очистки
КФ1	Цитозоль	0,67	4,9	0,205	22,40
КФ2	Цитозоль	0,53	5,8	0,269	22,30
КФ3	Цитозоль	0,41	7,1	0,105	8,48
КФ4	Лизосомы	0,32	6,3	0,053	4,98
КФ5	Лизосомы	0,23	6,6	0,050	5,08
КФ6	Лизосомы	0,21	7,1	0,047	5,06

Субстратную специфичность кислых фосфатаз определяли с различными синтетическими и природными эфирами ортофосфорной кислоты (табл. 2).

Таблица 2. Субстратная специфичность кислых фосфатаз из пищеварительной железы живородки речной

Субстрат	Активность, %*					
	КФ1	КФ2	КФ3	КФ4	КФ5	КФ6
р-Нитрофенилфосфат	100	100	100	100	100	100
α-Нафтилфосфат	75,4	—	—	63,8	48,6	36,4
α-Глицерофосфат	55,7	16,7	0,0	32,8	18,6	19,3
β-Глицерофосфат	73,8	16,7	0,0	14,8	13,2	0,0
Глюкозо-1-фосфат	19,8	—	0,0	—	0,0	0,0
Глюкозо-6-фосфат	73,8	—	0,0	—	0,0	0,0
Фруктозо-6-фосфат	57,4	27,8	0,0	53,4	—	71,1
Фруктозо-1,6-дифосфат	103	55,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Рибозо-5-фосфат	31,1	—	0,0	—	—	0,0
АТФ	52,5	—	0,0	23,8	14,3	0,0
АДФ	10,0	15,2	360	15,6	0,0	0,0
АМФ	0,0	12,3	0,0	12,6	—	0,0

*Примечание: прочерк — нет данных.

Анализ физико-химических параметров представленных кислых фосфатаз позволил выявить ряд их особенностей. Так, в частности КФ3, локализованная в цитозоле, проявляет гидролитическую активность в отношении только одного из природных субстратов — аденозиндифосфата. При этом скорость гидролиза АДФ в 3,6 раза выше, чем р-нитрофенилфосфата, тогда как АТФ и АМФ не гидролизуются вообще. Таким образом, КФ3 — специфический фермент, и притом довольно необычный. В литературе часто рассматривают свойства и функции гидролаз, расщепляющих нуклеозиддифосфаты, однако, хорошо известны пока только две из них. Нуклеозиддифосфатаза (КФ 3.6.1.6), выделенная из печени и почек позвоночных животных, кроме АДФ расщепляет инозиндифосфат, гуанозиндифосфат, уридиндифосфат и D-рибозо-5-фосфат; другой фермент, так называемая апираза (КФ 3.6.1.5), найденная у растений, но распространенная и у млекопитающих, гидролизует АТФ и АДФ. Оба фермента используют в качестве кофактора двухвалентные ионы щелочноземельных металлов (Mg^{2+} и Ca^{2+} соответственно). В то же время полное отсутствие гидролитической активности КФ3 в отношении D-рибозо-

5-фосфата и АТФ (см. табл. 2), а также установленная нами независимость от присутствия Mg^{2+} и Ca^{2+} в реакционной среде (обработка 1 мМ ЭДТА $\times$ Na₂), свойственная большинству кислых фосфатаз, не дают оснований считать этот фермент нуклеозиддифосфатазой или апиразой. Судя по экспериментальным данным, кислая АДФаза из пищеварительной железы живородки речной — новая, впервые обнаруженная нуклеозиддифосфат-фосфогидролаза.

Другая особенность касается двух цитозольных фосфатаз: КФ1 и КФ2, способных гидролизовать диэфир ортофосфорной кислоты — фруктозо-1,6-дифосфат (см. табл. 2), тогда как "классическая" КФ является гидролазой моноэфиров. Более того, наши данные показывают, что КФ1 и КФ2 расщепляют фруктозо-1,6-дифосфат быстрее других природных субстратов.

Только КФ4 и КФ5 — ферменты, неспецифичные к субстрату, хотя некоторые природные ортофосфаты не расщепляют. КФ4, например, не активна в отношении фруктозо-1,6-дифосфата, КФ5 — в отношении глюкозо-1-фосфата, глюкозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-дифосфата. Другие природные субстраты КФ4 и КФ5 гидролизуют заметно медленнее, чем р-нитрофенилфосфат (см. табл. 2).

Индукцируемая хлоридом кадмия *in vivo* КФ6 специфична к фруктозо-6-фосфату, медленно расщепляет α -глицерофосфат и не действует ни на один из других природных субстратов.

Таким образом, при интоксикации организма живородки активность индуцибельной КФ6, а также КФ1 и КФ2, активность которых при этом резко возрастает, должна привести к торможению гликолитического распада углеводов и накоплению побочных метаболитов — свободной фруктозы, глюкозы и глицерина. В тоже время другая специфическая фосфатаза КФ3, способная активировать гликолиз через посредство гликогенфосфорилазы, при токсическом воздействии полностью инактивируется.

Обмен побочных метаболитов в состоянии стресса. Судя по литературным данным, накопление побочных метаболитов, в частности ряда свободных углеводов (фруктоза, глюкоза и др.) и многоатомных спиртов

(глицерин, сорбит) в крови, лимфе и других тканях и органах у водных животных является одним из способов приспособления к понижению температуры воды. В частности, это явление хорошо изучено у лососёвых рыб и личинок некоторых видов насекомых, которые склонны к миграциям, далеко выходящим за пределы одной климатической зоны. Исследованные нами виды животных, и в том числе речная живородка, также постоянно испытывают изменения температуры воды, происходящие как в течение года, так и в более сжатые сроки — в периоды межсезонья, поэтому вполне вероятно, что механизм регуляции гликолиза и возможность накопления побочных метаболитов в качестве криопротекторов существуют и у этого объекта.

Для проверки этой гипотезы мы изучили качественный состав и количественную динамику содержания полиолов в пищеварительной железе живородки речной, в норме и в остром опыте со стресс-индуцирующими факторами — воздействием холода (до 4°C) и хлорида кадмия (0,005 мг Cd^{2+} /л) продолжительностью 1, 4 и 11 суток.

Методом ВЭЖХ нами показано, что в экстракте пищеварительной железы живородки речной действительно присутствует сорбит (хроматограмма, построенная по данным рефрактометрических замеров, содержала один пик, по времени удержания соответствующий сорбиту, глицерин выявлен не был). С целью охарактеризовать адаптивную динамику его содержания в ткани пищеварительной железы мы исследовали изменения концентрации сорбита и активность сопутствующих ферментов — сорбитолдегидрогеназы (КФ 1.1.1.14) и альдозоредуктазы (КФ 1.1.1.21), непосредственно связанных с превращением сорбита из фруктозы и глюкозы, соответственно, а поскольку эти реакции обратимы, то и вовлечением сорбита в метаболизм углеводов.

Результаты экспериментов показывают, что при понижении температуры среды обитания у моллюсков уже через сутки наблюдается увеличение активности дегидрогеназ и, соответственно, содержание сорбита в пищеварительной железе, образующегося приблизительно из равных долей глюкозы и фруктозы. Однако затем активность сорбитолдегидрогеназы резко

снижается и последующее накопление сорбита возможно только путем восстановления из глюкозы (рис. 7, А).

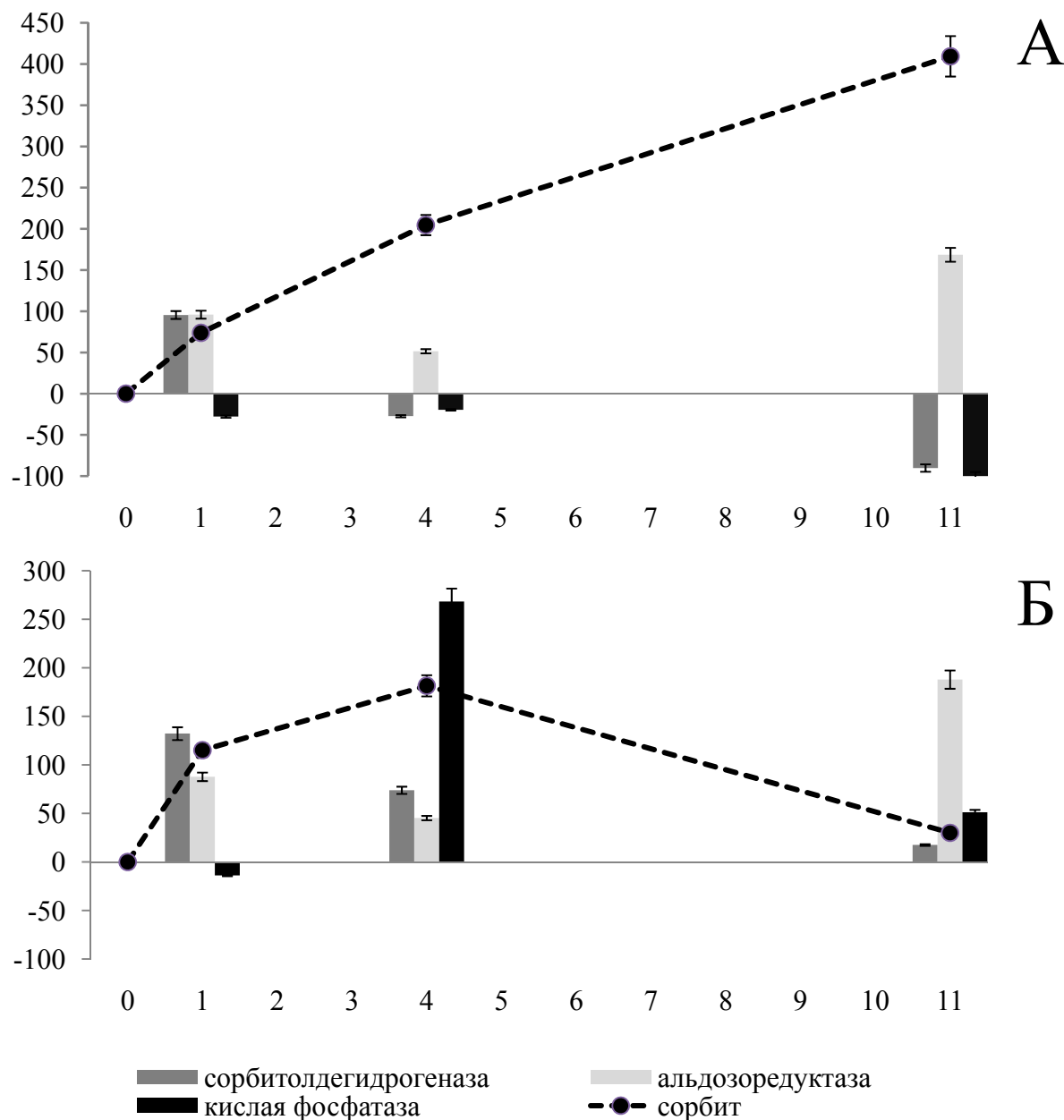


Рис. 7. Динамика содержания сорбита и активности сопутствующих ферментов пищеварительной железы живородки речной при понижении температуры и интоксикации. По оси абсцисс — экспозиция опыта, сут.; по оси ординат — отклонение активности ферментов и содержания сорбита от контроля, %. Условные обозначения: А — понижение температуры, Б — интоксикация хлоридом кадмия.

Кислые фосфатазы при понижении температуры практически не активны, однако известно, что глюкоза и фруктоза могут накапливаться в свободном виде заранее или в первый момент понижения температуры, неустановленный нами, как бы формируя резервный пул предшественников сорбита,

предназначенный для адаптации к периодическому понижению температуры воды.

При токсическом воздействии сорбит образуется преимущественно из фруктозы, чему способствует существенное увеличение активности сорбитолдегидрогеназы, преобладающей над альдозоредуктазой, и кислых фосфатаз, превращающих фруктозо-6-фосфат во фруктозу (рис. 7, Б). В тоже время, накопление сорбита в пищеварительной железе моллюска происходит лишь в начале опыта, уже через одиннадцать суток экспозиции его содержание резко падает, но при этом сорбит превращается преимущественно в глюкозу, т.к. активность сорбитолдегидрогеназы приближается к контрольному значению, тогда как у альдозоредуктазы возрастает почти вдвое.

Вероятно, сорбит у моллюсков служит не только криопротектором, точнее, он является защитным фактором в более широком смысле, который позволяет снизить повреждающее воздействие, в том числе и токсических веществ, подобно свободным углеводам (глюкоза, мальтоза), выполняющим роль неспецифических защитных метаболитов у дрожжей, уменьшая текучесть клеточных мембран. Снижение содержания сорбита у подопытных моллюсков через 11 суток после внесения токсиканта в среду их обитания можно объяснить фактическим снижением токсической нагрузки из-за частичной сорбции кадмия живыми организмами и стеклянными стенками сосуда, а также вследствие специфической адаптации моллюсков к кадмию путем связывания его металлотионеинами.

Исследование сезонной динамики сорбита в пищеварительной железе живородки речной, показало, что, во-первых, сорбит действительно накапливается к наступлению зимы и вновь вовлекается в обмен к лету (мкмоль/г ткани: 1,31 — осенью, 156 — зимой, 1,37 — весной, 0,68 — летом) и во-вторых, ответная реакция на острое воздействие холода (4°C) и токсиканта (0,005 мг Cd²⁺/л) однообразна во все сезоны (несколько более сглажена зимой из-за высокого содержания сорбита в норме), т.е. "медленная" сезонная

адаптация не исключает "быстрой" адаптации в стресс-индуцирующему воздействию в остром опыте.

Резюмируя данные экспериментов по динамике сорбита и активности сопутствующих ферментов (фосфатазы, оксидоредуктазы) можно предложить следующую схему их участия в формировании устойчивости к понижению температуры и токсической нагрузке (рис. 8).

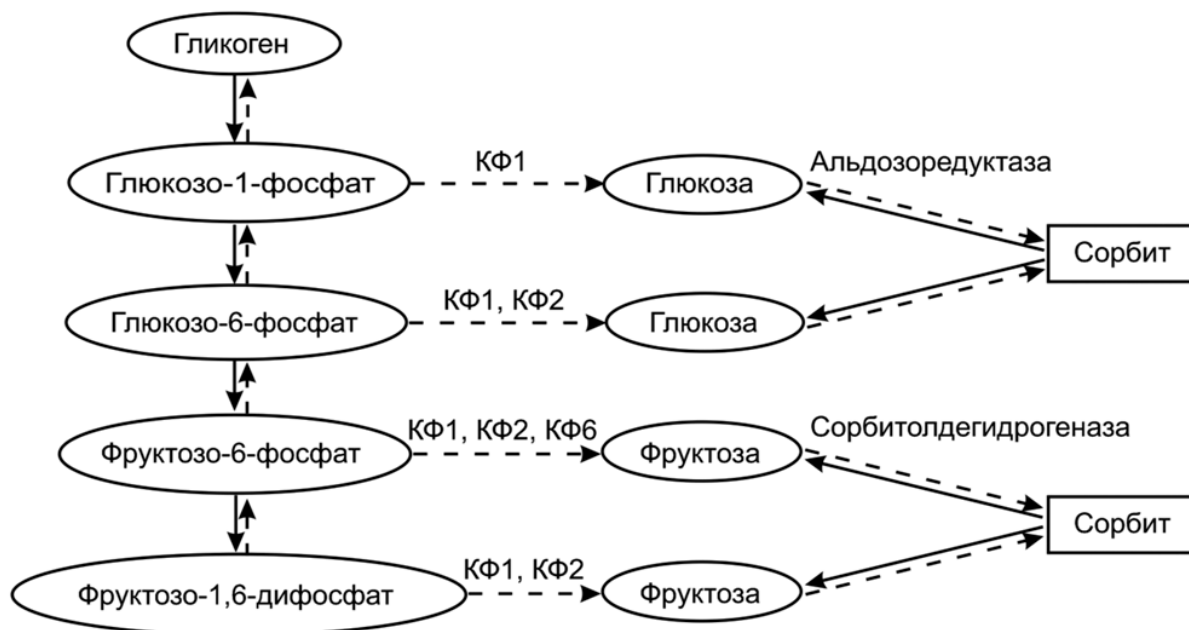
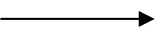
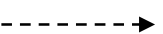


Рис. 8. Схема превращения углеводов и образования сорбита в пищеварительной железе живородки речной.

Условные обозначения:

-  — промежуточные продукты обмена;
-  — конечные продукты обмена;
-  — реакции распада углеводов;
-  — реакции, тормозящие распад углеводов, способствующие накоплению побочных метаболитов

Таким образом, выявленные нами стресс-редуцирующие биохимические факторы у живородки речной, возникающие в ответ на воздействие холода и токсического вещества, принципиально не отличаются по результату — накоплению сорбита (по крайней мере, в течение четырёх суток экспозиции), однако варьируют по своему механизму, а именно: 1) участию фосфатаз, которое весьма значительно при интоксикации и ничтожно мало при адаптации к холоду, 2) источнику углеводов — предшественников сорбита, при

интоксикации таковым является преимущественно фруктоза как промежуточный продукт распада углеводов, в состоянии адаптации к холоду, вероятнее всего, — глюкоза и фруктоза, как продукты гидролиза полисахаридов, 3) продукту восстановления сорбита, которым является преимущественно фруктоза после токсического воздействия и глюкоза — при понижении температуры.

Биохимическое тестирование стоков и индикация природной воды.

В качестве тест-функции или тест-показателя при биологическом тестировании чаще всего принимают выживаемость тест-организма (например, "дафниевый тест") или скорость размножения (например, тест на одноклеточных водорослях рода *сценедесмус* и др.), реже — потребление кислорода, интенсивность питания или двигательную активность животных в тестируемой воде. Мы использовали суммарную активность хорошо изученного нами комплекса кислых фосфатаз живородки речной. В результате было показано, что достоверное увеличение активности кислых фосфатаз находится в прямой зависимости от концентрации примеси практически во всей серии разбавлений и наблюдается уже в 2%-ной сточной воде (табл. 3).

Таблица 3. Активность комплекса кислых фосфатаз живородки речной и некоторые характеристики качества сточной воды, использованной в эксперименте

Концентрация сточной воды в пробе, %	Суммарная активность кислых фосфатаз* через 96 ч., Е/мг белка	Характеристики качества воды*			
		Конц. O ₂ , мг/л	ХПК, мг O ₂ /л	БПК ₅ , мг O ₂ /л	Выживаемость <i>D. magna</i> за 96 ч., %
100	8,07±0,18 (+)	2,62	2100	65,5	0,0 (+)
50	11,64±0,22 (+)	4,96	1238	77,4	30,8 (+)
20	10,34±0,21 (+)	6,36	720	82,8	92,3 (+)
10	8,65±0,19 (+)	7,09	548	85,1	98,8 (–)
4	7,33±0,18 (+)	7,46	444	86,4	100,0 (–)
2	6,38±0,16 (+)	7,65	410	86,8	100,0 (–)
1	6,03±0,12 (–)	7,71	393	87,3	100,0 (–)
Контроль	5,92±0,12	7,79	375	87,2	100,0

*Примечание: (+) — отклонение от контроля статистически достоверно с вероятностью 0,95; (–) — отклонение от контроля недостоверно.

Испытание качества сточной воды с помощью традиционных методов убедительно подтверждают её выраженные токсические свойства. Судя по высокому значению бихроматной окисляемости (ХПК) и крайне низкому содержанию кислорода, сточная вода содержит большое количество недоокисленных компонентов, а небольшое биологическое потребление кислорода (БПК₅) в этой воде указывает на то, что эти компоненты, скорее всего, имеют небиотическую природу. Кроме того, неразбавленная сточная вода вызывает 100%-ную гибель дафний, причем токсические свойства воды по отношению к дафниям сохраняются до разбавления ее в 5 раз (20% сточной воды в пробе). Бóльшая кратность разбавления сточной воды полностью нивелирует летальное действие на дафний и отклонения от контроля по другим характеристикам качества (содержание O₂, показатели ХПК, БПК₅).

Для биохимической индикации природной воды мы использовали комплекс кислых фосфатаз из пищеварительной железы трёх видов моллюсков: живородки, беззубки и перловицы. Оптимизация pH инкубационной среды выявила, что у кислых фосфатаз перловицы наблюдается два чётких пика активности — при pH 3,4 и 4,8. В соответствии с этим фосфатазы перловицы обозначили как КФ1 и КФ2 и определяли отдельно. Район сбора биологического материала охватывал приустьевой участок реки Которосль (г. Ярославль), станции сбора привязывали к наиболее вероятным источникам техногенного загрязнения, контролем считали станцию №4, расположенную рядом с установкой водоотбора питьевой воды (рис. 9).

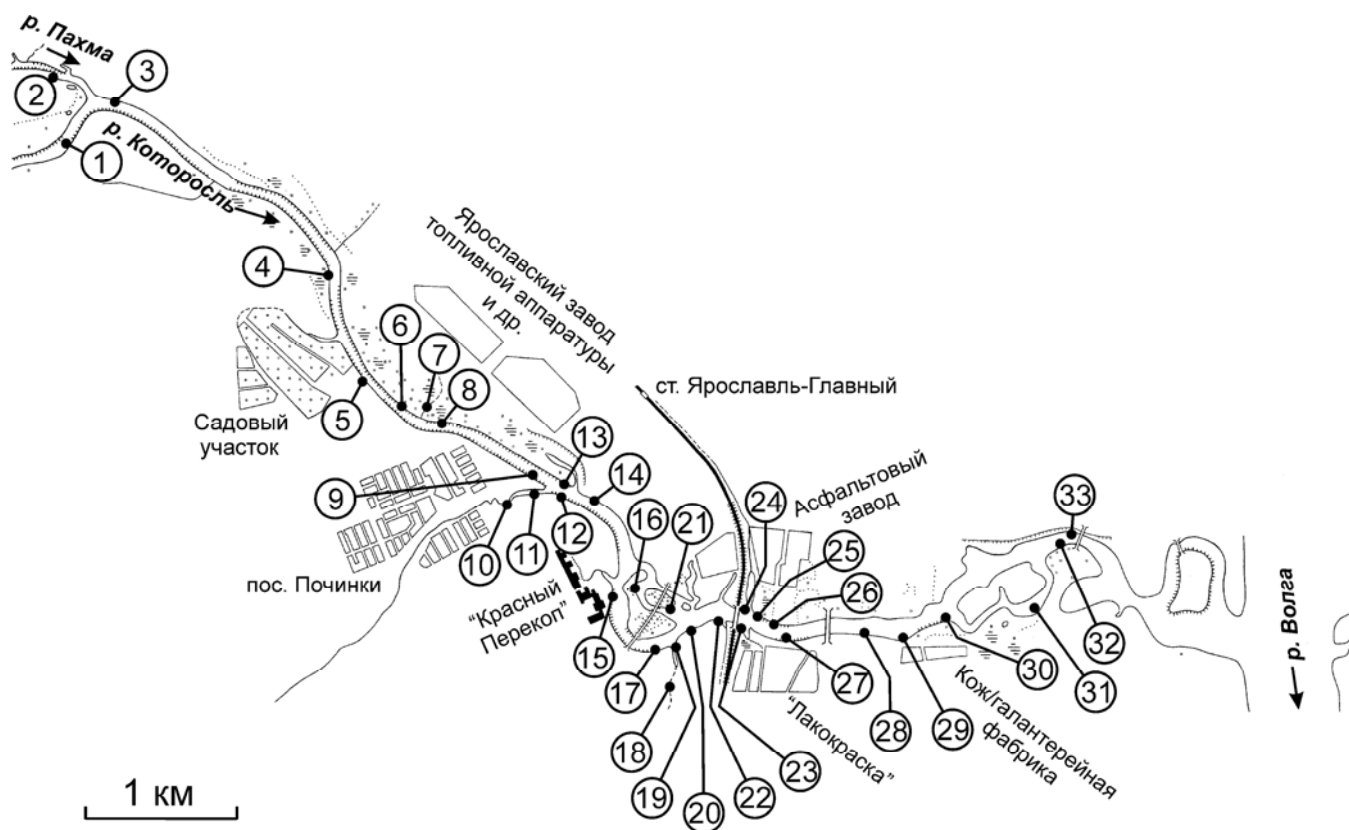


Рис. 9. Схема приустьевое участка р. Которосль, в кружках — номера станций сбора биологического материала

Для сравнения производили биологическую индикацию качества воды по ряду традиционных показателей состава макрозообентоса (данные получены и опубликованы совместно с сотрудниками биологического факультета Ярославского государственного университета В.П. Семерным и С.Л. Зарубиным). Результаты исследований однозначно свидетельствуют о монотонном нарастании загрязненности русла реки вниз по течению. Динамика активности кислых фосфатаз у исследованных моллюсков имеет аналогичную тенденцию — постепенно увеличивается, коррелируя с расстоянием от контрольной станции сбора материала (рис. 10).

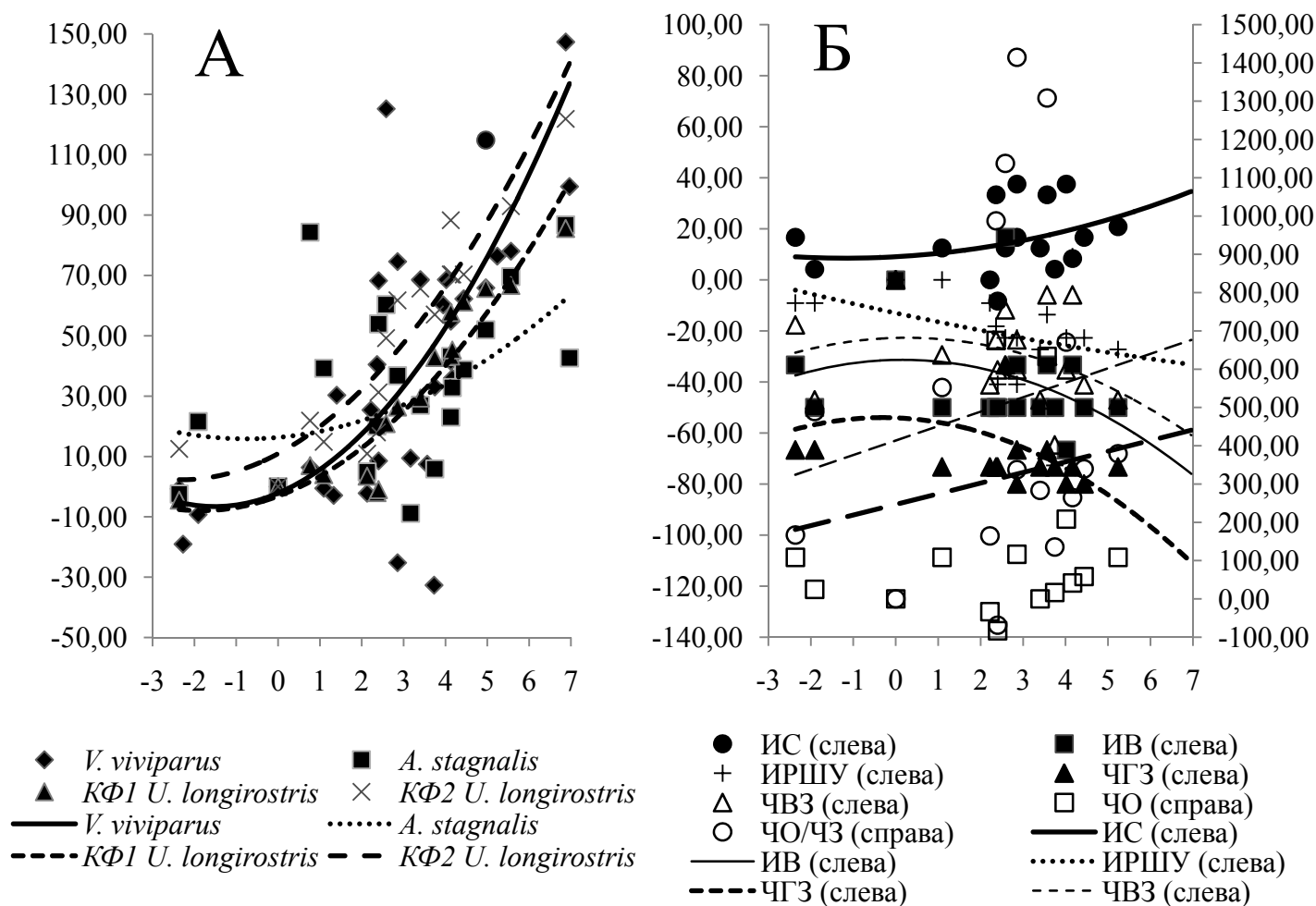


Рис. 10. Данные биохимической и биологической индикации качества воды в приустьевом участке реки Которосль. По оси абсцисс — расстояние от контрольной станции №4 по руслу реки, км; по осям ординат — отклонение результатов от контроля, %. Условные обозначения: А — активность кислой фосфатазы моллюсков, Б — критерии биологической индикации на примере макрозообентоса, ИС — индекс сапробности Пантле и Букк, ИВ — биотический индекс Вудивисса, ИРШУ — индекс разнообразия Шеннона–Уивера, ЧГЗ — численность групп зообентоса, ЧВЗ — численность видов зообентоса, ЧО — численность олигохет, ЧО/ЧЗ — отношение численности олигохет к общей численности видов зообентоса.

Искусственное переселение экспериментальных групп особей живородки речной на 7 суток, собранных на относительно чистых и загрязнённых участках реки, подтвердило закономерность выявленных в ходе биохимической индикации наблюдений. Переселение на загрязненный участок водоёма приводит к достоверному увеличению активности комплекса кислых фосфатаз, на относительно чистый — к снижению (табл. 4).

Таблица 4. Активность кислой фосфатазы живородки речной в опыте с искусственным переселением на 7 суток

Станция сбора	9			28			32		
Станция переселения	9	28	32	9	28	32	9	28	32
Активность, Е/мг белка	4,81*	7,11	8,98	6,54	8,24*	11,31	9,51	12,31	14,36*
Изменение активности в опыте, %	0,0	+47,8	+86,7	-36,0	0,0	+37,3	-33,8	-16,7	0,0
Степень приближения к активности в природе**, %	100,0	86,3	62,5	73,5	100,0	78,8	50,6	66,9	100,0

Примечания.

*Контрольное значение активности, использованное для расчёта изменений в опыте

**Определена у животных в садках относительно свободноживущих на той же станции по окончании опыта

Интересно отметить, что изменения активности фермента у переселённых особей живородки в опыте не достигают величин, характерных для аборигенов (см. табл. 4). Наиболее вероятной причиной тому является возникновение генетически обусловленной изменчивости между популяциями живородки, изолированными значительным расстоянием, практически непреодолимым для вида, привязанного к субстрату на всех стадиях своего развития.

Таким образом, примеры биохимического тестирования и индикации позволяют утверждать, что исследование динамики активности ферментов при интоксикации имеет очевидное практическое применение в качестве если не альтернативы, то существенного дополнения традиционным методам оценки качества природных и сточных вод.

Закключение. Существование стресса и неспецифической адаптации у животных, значительно отличающихся по уровню организации от млекопитающих (насекомые, моллюски, кольчатые черви), доказать весьма проблематично *a priori*, поскольку к большинству из них не применима диагностика этого явления по комплексу функциональных маркеров, практикуемая в клинической патологии. Ещё сложнее создать условия для возникновения стресса, такие, чтобы интенсивность воздействия на организм, с одной стороны, превосходила привычную (к которой организм уже адаптирован) и тем самым индуцировала у него закономерную и адекватную

ответную реакцию (эустресс), с другой стороны, не была чрезмерной и не вызывала коллапс защитных систем организма с необратимым нарушением гомеостаза (дистресс).

Судя по нашему опыту, наиболее существенным параметром для проведения токсикологических экспериментов является величина ПДК — концентрация вредных веществ, которая по результатам биологического тестирования не вызывает патологий у ряда тестовых организмов (Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО, 1998). Ориентируясь на эту величину, нам удалось создать сопоставимые условия токсикологических экспериментов с разными по степени токсичности веществами, а также пронаблюдать ответную реакцию на достаточно большом отрезке времени (до 4 суток) и при этом избежать дистресса и слишком интенсивного стресса у подопытных животных, когда стадия сопротивляемости быстро сменяется стадией истощения.

Важнейшим признаком стресс-реакции, а, следовательно, и стресса у различных по уровню организации водных животных при интоксикации на биохимическом уровне является колебательная динамика активности ферментов, достоверно превышающая по амплитуде естественную, наблюдаемую в контроле. Эта динамика универсальна в отношении воздействия разных токсических веществ и стереотипна для множества ферментных систем, не связанных с детоксикацией, и разных видов пресноводных гидробионтов, что позволяет рассматривать её как метаболический фактор неспецифической (срочной) адаптации и использовать для эколого-биохимического мониторинга загрязнений пресных вод. Однако при ближайшем рассмотрении выясняется, что изменения качественного состава множественных форм ферментов, наблюдаемые, как правило, значительно позднее их суммарной ответной реакции, сугубо специфичны и представляют собой механизм адаптивной настройки метаболизма.

В частности, для комплекса кислых фосфатаз нами определена роль регуляторов интенсивности гликолиза и факторов накопления свободных углеводов глюкозы и фруктозы у моллюска живородка речная. Этот стресс-редуцирующий фактор также можно считать неспецифическим, поскольку аналогичная реакция наблюдается в ответ на холодовой стресс, совершенно не схожий с интоксикацией. В тоже время активность сорбитолдегидрогеназы и альдозоредуктазы, сопутствующих превращению свободных углеводов в сорбит и обратно, а также динамика содержания самого сорбита в органах и тканях моллюска специфичны в отношении стресс-индуцирующего воздействия (переохлаждение или интоксикация), а, следовательно, являются факторами устойчивой адаптации. Если же принять за истину предположение, что сорбит у моллюсков действительно может служить защитным метаболитом в условиях токсической нагрузки (косвенные подтверждения тому мы получили в эксперименте с живородкой речной), его повышенное содержание в пищеварительной железе представляет собой структурный след устойчивой адаптации, позволяющий легче переносить повторную интоксикацию.

Таким образом, биохимический механизм стресс-реакции моллюсков на токсическое воздействие состоит в индукции генерализованной колебательной динамики активности ферментов как фактора срочной адаптации, закономерное перераспределение активности между фосфатазами с разной субстратной специфичностью или формировании базы для устойчивой адаптации и, как следствие, генерации устойчивого адаптивного ответа, а именно накопления побочных метаболитов — глюкозы, фруктозы и сорбита и их взаимопревращения с участием соответствующих ферментов. Участие других специфических стресс-редуцирующих факторов в формировании структурного следа, таких как металлотионеины или комплекс цитохромов P₄₅₀, также возможно, но их координация с динамикой активности ферментов остаётся не выясненной. Вероятнее всего их индукция связана не с метаболическим, а мембранным или другим биохимическим уровнем адаптации, исследование которых в рамки настоящего исследования не входит.

Выводы:

1. Охарактеризована стресс–редуцирующая реакция на сублетальное токсическое воздействие, установлены механизмы и выявлена взаимосвязь срочной и устойчивой адаптации с участием комплекса кислых фосфатаз у пресноводного моллюска живородка речная (*Viviparus viviparus* L.).

2. Биохимические механизмы адаптации к токсическому воздействию имеют общебиологическую природу, однообразно определяются у различных по организации видов гидробионтов и проявляются в закономерных колебаниях активности гидролитических и окислительно–восстановительных ферментов относительно контроля (нормы), которые имеют вид циклической фазной зависимости от экспозиции токсического воздействия. Среди исследованных видов гидробионтов можно выделить токсикодинамичные (беспозвоночные), отличающиеся большими колебаниями активности ферментов (в 2 и более раз относительно контроля), и гомеостатичные (рыбы), у которых амплитуда колебаний ферментативной активности не высока (в 1,5 раза и менее).

3. Химическая природа токсического вещества (тяжелые металлы, органические вещества) и его концентрация не отражается на форме зависимости активности ферментов от продолжительности опыта, а влияет только на величину изменения активности ферментов.

4. Закономерные однообразные колебания активности гидролитических и окислительно–восстановительных ферментов, индуцированные острым токсическим воздействием, являются биохимическим компонентом неспецифического адаптационного синдрома у гидробионтов и служат срочными стресс–редуцирующими факторами, позволяющими корректировать метаболизм при интоксикации.

5. Адаптивная динамика биохимических параметров при интоксикации у рыб может быть выражена слабо из–за частичного замещения (предупреждения) более высокими уровнями адаптации и, прежде всего, поведенческим, сопряженным со способностью свободно передвигаться на

значительные расстояния и таким образом избегать локальных загрязнений водоёма.

6. Состав множественных форм ферментов при интоксикации гидробионтов меняется разнообразно, и зависит от типа токсиканта, его концентрации и продолжительности воздействия. Форму кривой биохимической адаптации в целом определяют суммарные ферментативные реакции, тогда как функции каждого из ферментов состоят в специфической коррекции метаболизма посредством активности отдельных множественных форм.

7. Молекулярные формы кислой фосфатазы речной живородки впервые охарактеризованы по электрофоретической подвижности, изоэлектрической точке и субстратной специфичности. Установлено, что в зависимости от большего или меньшего сродства к органическим фосфатам, изученные ферменты могут тормозить или интенсифицировать гликолиз, и, следовательно, обмен углеводов в пищеварительной железе моллюска.

8. В пищеварительной железе речной живородки при интоксикации *in vivo* происходит индукция одной из форм кислой фосфатазы — КФ 6. Фермент специфичен к фруктозо-6-фосфату (71% активности по отношению к р-нитрофенилфосфату), медленно расщепляет α -глицерофосфат (19% по отношению к р-нитрофенилфосфату) и не действуют ни на один из других природных субстратов, а потому способствует торможению гликолиза и накоплению побочных продуктов метаболизма углеводов (фруктозы, сорбита, глюкозы). Относительная электрофоретическая подвижность КФ 6 в 5,7%-ном ПААГ составляет 0,21, изоэлектрическая точка равна 7,1.

9. Впервые определено содержание сорбита в пищеварительной железе живородки речной в разные сезоны (осенью — $1,31 \pm 0,08$, зимой — $155,95 \pm 3,85$, весной — $1,37 \pm 0,07$, летом — $0,68 \pm 0,06$ мкмоль/г ткани) и в острых лабораторных опытах. При содержании моллюсков в холодной воде происходит накопление сорбита (до 508% по отношению к контролю). При интоксикации организма моллюска содержание сорбита увеличивается в разной

степени в зависимости от экспозиции (от 117 до 283% по отношению к контролю).

10. Динамика содержания сорбита в пищеварительной железе живородки речной вызвана изменением активности кислых фосфатаз, сорбитолдегидрогеназы и альдозоредуктазы, которые в зависимости от характера внешнего воздействия, способствуют накоплению сорбита в организме моллюска или его обратному вовлечению в метаболизм углеводов. Реакция этих ферментов на интоксикацию организма и воздействие холода различна, в соответствии с чем изменение содержания сорбита в течение острого опыта происходит по-разному: при понижении температуры монотонно нарастает, при интоксикации колеблется, повышаясь относительно контроля и вновь возвращаясь в первоначальному уровню.

11. Кислые фосфатазы пищеварительной железы речной живородки служат эффекторами для срочной стресс-редуцирующей (адаптивной) регуляции углеводного обмена. Её сущность состоит в модуляции гликолиза (изъятии промежуточных продуктов углеводного обмена) и индукции накопления сорбита как устойчивого стресс-редуцирующего фактора (криопротектора, модулятора текучести и проницаемости клеточных мембран), а при исчерпании адаптивного потенциала — вероятного индуктора апоптоза.

12. Изменения активности ферментов, наблюдаемые при интоксикации организма водных животных в остром опыте, могут служить биохимическим показателем загрязнения воды. Этот показатель в отличие от физико-химических является синергическим, т.е. отражает комплексное воздействие всей взаимозависимой совокупности загрязнения воды и, одновременно характеризуется высокой чувствительностью (на уровне ПДК_{водн.} и ниже) и динамичностью, поскольку первые изменения обнаруживаются уже через несколько часов экспозиции подопытных животных в исследуемой воде.

13. На примере трёх видов моллюсков *Viviparus viviparus* L., *Anodonta stagnalis* Gmelin, *Unio longirostris* Rossmassler показано, что многолетняя изоляция на экологически чистых и в разной степени загрязнённых участках

водоема приводит к возникновению межпопуляционных различий в суммарной активности кислой фосфатазы, которые сохраняются после вынужденного (искусственного) переселения, а значит, являются следствием генетической изменчивости. Эта изменчивость может количественно характеризовать степень техногенного загрязнения природных вод.

Содержание работы в основном отражено в следующих публикациях:

Монография:

Цветков И.Л., Коничев А.С. Экологическая биохимия гидробионтов. М.: Изд-во МГОУ, 2006. 104 с. (6,5 п.л., авторский вклад — 85%).

Патент на изобретение:

Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Способ определения токсического загрязнения сточных и природных пресных вод. / Патент РФ №2308719. // Опубликовано 20.10.2007. Бюлл. № 29 (1,38 п.л., авторский вклад — 50%).

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Цветков И.Л., Зарубин С.Л., Урванцева Г.А., Коничев А.С., Филиппович Ю.Б. Кислая фосфатаза гидробионтов как фермент-индикатор биохимической адаптации к воздействию токсических веществ. // Известия АН. Серия биологическая. 1997. №5. С. 539–545 (0,44 п.л., авторский вклад — 60%).
2. Попов А.П., Коничев А.С., Цветков И.Л. Влияние токсичных соединений техногенного происхождения на активность и множественные формы кислой ДНКазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.). // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. №5. С. 518–523 (0,38 п.л., авторский вклад — 25%).
3. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Комплекс кислых фосфатаз живородки речной в норме и при интоксикации ионами кадмия. // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 12. С. 1648–1656 (0,56 п.л., авторский вклад — 70%).

4. Цветкова М.А., Цветков И.Л., Коничев А.С. Содержание гликоалкалоидов и состав белков в листьях картофеля при повреждении колорадским жуком. // С.-х. биология. Серия: Биология растений. 2004. №1. С. 97–104 (0,50 п.л., авторский вклад — 35%).
5. Сеитова А.М., Игнатов А.Н., Супрунова Т.П., Цветков И.Л., Дейнеко Е.В., Дорохов Д.Б., Шумный В.К., Скрыбин К.Г. Оценка генетического разнообразия дикорастущей сои (*Glycine soja* Siebold et Zuss.) в Дальневосточном регионе России. // Генетика. 2004. Т. 40, №2. С. 224–231 (0,50 п.л., авторский вклад — 20%).
6. Коничев А.С., Попов А.П., Цветков И.Л., Филков П.В. Ферменты как биохимические маркеры загрязнения воды. // Приложение к Вестнику МГОУ. Серия «Естественные науки». География, экология, экономика: актуальные проблемы науки и образования. М.: Изд-во МГОУ, 2005. С. 151–153 (0,19 п.л., авторский вклад — 20%).
7. Цветков И.Л., Цветкова М.А., Зарубин С.Л., Семерной В.П., Коничев А.С. Оценка качества сточных и природных вод с помощью биохимического показателя — активности кислой фосфатазы пресноводных моллюсков. // Водные ресурсы. 2006. Т. 33. №1. С. 62–70 (0,56 п.л., авторский вклад — 65%).
8. Попов А.П., Цветков И.Л., Коничев А.С. Биохимическое тестирование токсического загрязнения вод: планирование эксперимента и выбор тест-объекта. // Вестник МГОУ. Серия Естественные науки. 2006. № 4. С. 87–92 (0,38 п.л., авторский вклад — 20%).
9. Попов А.П., Цветков И.Л., Коничев А.С. Разделение и характеристика дезоксирибонуклеаз гепатопанкреаса живородки речной в норме и при модельной интоксикации *in vivo*. // Биохимия. 2008. Т. 73. Вып. 8. С. 1161–1167 (0,44 п.л., авторский вклад — 25%).
10. Цветков И.Л., Коничев А.С. Стресс-индуцированная динамика сорбита и активности сопутствующих ферментов в пищеварительной железе

живородки речной. // Биохимия. 2009. Т. 74. Вып. 11 — в печати (0,37 п.л., авторский вклад — 90%).

Депонированная рукопись:

Цветков И.Л., Зарубин С.Л., Урванцева Г.А. Кислая фосфатаза разных внутривидовых форм катушки роговой как индикатор загрязнения вод тяжелыми металлами. Деп. в ВИНТИ от 15.03.95., №709–В95. 11 с. (0,69 п.л., авторский вклад — 75%).

Материалы Международных, Всероссийских и др. научных конференций:

1. Цветков И.Л., Урванцева Г.А. Влияние хлорида кадмия на активность кислой фосфатазы катушки роговой. // Экология и охрана окружающей среды. Тез. докл. I Международной IV Всероссийской научно–практической конференции (Рязань, 15–16 сентября 1994 г.). Рязань, 1994. С. 115 (0,06 п.л., авторский вклад — 90%).
2. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Уровень активности кислой фосфатазы у моллюсков на различных по степени загрязнения участках реки. // Мат. X Междунар. науч. конф. "Эколого–биологические проблемы бассейна Каспийского моря и водоемов внутреннего стока Евразии" (Астрахань, 25–30 апреля 2008 г.). Астрахань, 2008. С. 125–127 (0,13 п.л., авторский вклад — 75%).
3. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Стресс–индуцированная динамика сорбита и активности сопутствующих ферментов в пищеварительной железе живородки речной. // Сб. мат. Междунар. научно–практич. конференции "Актуальные проблемы биоэкологии" (Московский областной государственный университет, 21–24 октября 2008 г.). М.: Изд–во МГОУ, 2008. С. 70–72 (0,13 п.л., авторский вклад — 75%).
4. Попов А.П., Цветков И.Л., Коничев А.С. Комплекс дезоксирибонуклеаз живородки речной и его реакция на токсическое воздействие *in vivo*. // Материалы III Всероссийской конференции по водной токсикологии,

- посвященной памяти Б.А. Флерова (Борок, 11–16 ноября 2008 г.). Борок, 2008. Ч. 2. С. 123–127 (0,31 п.л., авторский вклад — 20%).
5. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Влияние стресса на метаболизм сорбита в пищеварительной железе живородки речной. // Материалы III Всероссийской конференции по водной токсикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова (Борок, 11–16 ноября 2008 г.). Борок, 2008. Ч. 2. С. 182–186 (0,31 п.л., авторский вклад — 75%).
 6. Цветков И.Л., Урванцева Г.А., Зарубин С.Л., Коничев А.С. О возможности биохимического тестирования качества воды с помощью кислой фосфатазы некоторых гидробионтов // Материалы VII съезда Гидробиологического общества РАН (Казань, 14–20 октября 1996 г.). Казань: Полиграф, 1996. Т.3. С.93–94 (0,13 п.л., авторский вклад — 65%).
 7. Зарубин С.Л., Цветков И.Л., Урванцева Г.А. Изменение характеристик фермента кислая фосфатаза моллюсков *Viviparus viviparus* при воздействии сточных и природных вод. // Материалы VII съезда Гидробиологического общества РАН (Казань, 14–20 октября 1996 г.). Казань: Полиграф, 1996. Т. 3. С. 28–30 (0,19 п.л., авторский вклад — 45%).
 8. Цветков И.Л., Зарубин С.Л., Урванцева Г.А. Изменение активности кислой фосфатазы и белкового спектра экстракта тел моллюсков *Viviparus viviparus* как биохимические показатели степени токсичности природных вод. // Вузовская наука в решении экологических проблем Верхне–Волжского региона. Тез. докл. научной конференции (Ярославль, 18–19 апреля 1995 г.). Ярославль, 1995. С. 23 (0,06 п.л., авторский вклад — 75%).
 9. Зарубин С.Л., Цветков И.Л. Принципы выбора тест–объекта и тест–показателя для биоиндикации и биотестирования сточных и природных вод // Биологические исследования в Ярославском государственном университете. Тез. докл. конф. (Ярославль, 29 ноября 1996 г.). Ярославль, 1997. С. 62–65 (0,25 п.л., авторский вклад — 45%)

10. Зарубин С.Л., Цветков И.Л., Урванцева Г.А., Шляпникова Н.А. Исследование индуцированной резистентности *Daphnia magna* Straus к длительному воздействию хлорида хрома // Биологические исследования в Ярославском государственном университете. Тез. докл. конф. (Ярославль, 29 ноября 1996 г.). Ярославль, 1997. С. 70–71 (0,13 п.л., авторский вклад — 20%).
11. Цветков И.Л., Попов А.П. Энзимодиагностика загрязнений пресных вод с использованием кислой фосфатазы и дезоксирибонуклеазы живородки речной. // Экоотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии. Российская школа молодых учёных (28 октября — 3 ноября 2006 г., г. Пущино). Сборник статей. Пущино — Тула, 2006. С. 146–148 (0,19 п.л., авторский вклад — 50%).

Статьи в сборниках научных трудов:

1. Цветков И.Л. Изменчивость активности комплекса кислых фосфатаз моллюсков в адаптации организма к среде обитания. // Научные труды МПГУ им. В.И. Ленина. Серия: естественные науки. М.: Прометей, 1997. С. 71–72 (0,13 п.л., авторский вклад — 100%).
2. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С., Урванцева Г.А. Влияние хлорида кадмия на активность фосфатазного комплекса ферментов. // Научные труды МПГУ. Серия: Естественные науки. М.: Прометей, 1998. С. 242–243 (0,13 п.л., авторский вклад — 70%).
3. Коничев А.С., Попов А.П., Цветков И.Л. Влияние катионов металлов на активность и множественные формы ДНКазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.). // Труды Центра фундаментальных научных исследований МГОУ. М.: Изд-во МГОУ, 2005. №1. С. 75–78 (0,25 п.л., авторский вклад — 20%).