

## РОЛЬ $\text{Na}^+/\text{K}^+$ АТФАЗЫ В БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ И БИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

Е. И. Кяйвярйнен<sup>1</sup>, Е. В. Борвинская<sup>1</sup>, Г. Г. Серпунин<sup>2</sup>, М. М. Куклина<sup>3</sup>, Н. Н. Немова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук  
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия  
e-mail: hela\_kaiv@mail.ru

<sup>2</sup> ГОУ ВПО Калининградский государственный технический университет,  
г. Калининград, Россия

<sup>3</sup> Учреждение Российской академии Мурманский морской биологический институт  
Кольского научного центра РАН, г. Мурманск, Россия

### Введение

$\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФаза – фермент активного транспорта, встроенный в наружную плазматическую мембрану клетки, обеспечивает перенос ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  против их концентрационного градиента и участвует в процессах осмотической и ионной регуляции. Помимо непосредственной функции – создания оптимального внутриклеточного соотношения ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , этот фермент создает электрогенный мембранный градиент, который может обеспечивать перенос различных метаболитов, в том числе сахаров и аминокислот, через клеточную мембрану (Болдырев, 1998). В связи с важностью выполняемых функций, естественно предположить наличие сложной, гибкой, разноуровневой системы регуляции активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы, которая является одним из ключевых ферментов, вовлеченных в регуляцию ответа организма на воздействие окружающей среды. Целью ионной регуляции организмов является поддержание во внутренней среде наиболее благоприятного соотношения ионов, необходимого для нормального функционирования макромолекул в клетках.

Выяснение роли и участия  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы в биохимических механизмах развития адаптивных реакций в ответ на изменение факторов среды (абиотических и биотических) было проведено у различных объектов исследования: у рыб семейства осетровые – стерлядь (*Asipenser rutenus*) при адаптации к среде с различной соленостью и кислотностью и у птиц Баренцева моря: моевка (*Rissa tridactyla* L.), толстоклювые кайры (*Uria lomvia* L.), тонкоклювые кайры (*Uria aalge* Pontop L.) при гельминтной инвазии (биотический фактор).

Особенностью экологии эвригалинных видов, к которым относится стерлядь, является то, что в своем жизненном цикле они могут сталкиваться со значительными изменениями абиотических факторов среды обитания, в частности, солености и кислотности. Это положение справедливо и по отношению к стерляди, выдерживающей значения солености среды обитания до 10‰, тогда как для большинства представителей пресноводной ихтиофауны критическими являются значения выше 5–8‰ (Хлебович, 1974). Исследуемый диапазон кислотности среды (рН от 7,0 до 9,0) находится в пределах адаптивной нормы для стерляди. Уже первые детальное исследования экологии и физиологии разных видов осетровых показали высокую адаптивную пластичность, лежащую в основе биологического прогресса представителей этого семейства. Успех адаптации зависит от способности рыб перестраивать свой водно-солевой обмен. Учитывая генетическую близость стерляди к проходным осетровым, представляет интерес более глубокое раскрытие эффективных механизмов регуляции ионно-солевого баланса для поддержания устойчивости метаболизма в связи с проблемой возможной акклиматизации стерляди к водам Куршского залива Балтийского моря (Калининградская область).

Использование биохимических методов в эколого-паразитарных исследованиях на морских птицах актуальны, так как в циркуляции гельминтов в прибрежных морских экосистемах птицы играют особую роль (Куклин, Куклина, 2005). Птицы, используя в качестве пищевых объектов морских беспозвоночных и

рыб, зараженных гельминтами, становятся эндотермными хозяевами. Взаимоотношения в системе паразит-хозяин зависят от вида и свойств гельминта, и, с другой стороны, от интенсивности метаболизма хозяина. Паразитарная инвазия оказывает общее негативное воздействие на организм хозяина, но в его органах паразитарные семейства вызывают стимуляцию клеточного метаболизма для обеспечения собственной жизнедеятельности, так как гельминты не способны самостоятельно синтезировать многие вещества (Высоцкая, 1989). Гельминтная инвазия вызывает биохимические перестройки зараженных тканей, направленные на избирательное поглощение питательных веществ, и может привести к серьезным структурным и функциональным изменениям в органах. Поскольку известна роль  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в метаболизме клетки как одного из важнейших участников регуляции водно-солевого баланса и обеспечения переноса различных метаболитов, представляет интерес определить участие  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в адаптациях организма морских птиц к паразитарной инвазии.

### Материалы и методы

Исследование влияния абиотических факторов выполнено на сеголетках стерляди (*Asipenser ruthenus*), выращивание которой проводили в экспериментальных УЗВ (установки с замкнутым циклом водообеспечения) в аквариальной кафедре аквакультуры ФГОУ ВПО Калининградского Государственного технического

университета в течение 3 месяцев. В одной серии экспериментов по влиянию солености молодь стерляди выращивалась в трех аквариумах с различной концентрацией соли: I – 3‰; II – 6‰; III – контроль (0,3‰). В другой серии экспериментов по влиянию рН молодь выдерживалась в трех аквариумах с различными значениями рН: I – 7; II – 8; III – 9.

Добыча морских птиц производилась на мысе Крутик (Восточный Мурман) Баренцева моря. Препарирование птиц, получение биологического материала (печень), гельминтологическое обследование и видовая идентификация осуществлялась в секторе паразитологии ММБИ РАН (Куклин, Куклина, 2005). Исследованные кайры были заражены только цестодами: толстоклювые кайры цестодами сем. *Dilepithidae*, а тонкоклювые – цестодами сем. *Tetrabothriidae* и сем. *Hymenolepididae*. Моевки были поражены цестодами сем. *Tetrabothriidae*, сем. *Dilepithidae*, смешанное заражение цестодами сем. *Tetrabothriidae* и сем. *Dilepididae* и четвертая группа – трематодами *Cryptocotyle lingua*.

Активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы определяли по методу Елаева (Елаев и др., 1974), количество белка в пробе – по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

### Результаты и обсуждение

Полученные данные по определению активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в мышцах и жабрах стерляди, содержащейся в условиях различной солености, представлены на рисунке 1.

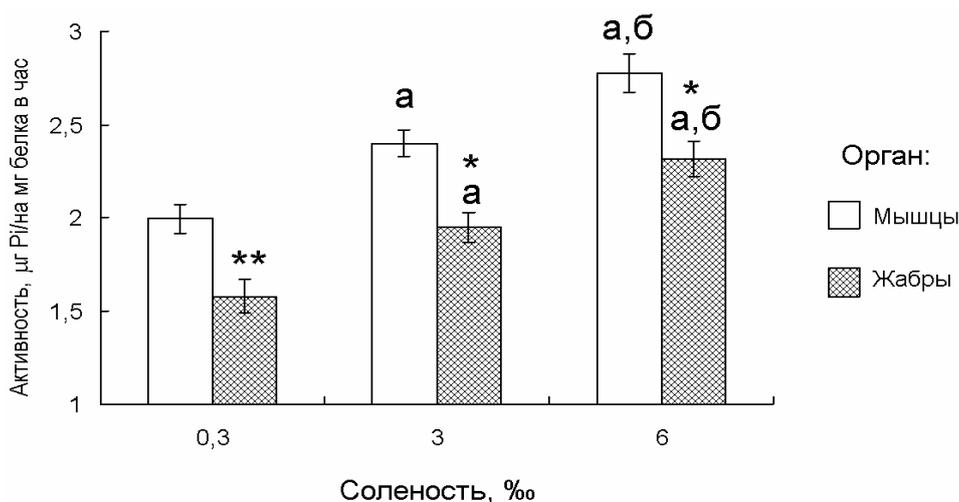


Рис. 1. Влияние солености среды на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы ( $\text{M}\pm\sigma$ ) в органах стерляди.

Различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с соленостью в контроле 0,3 ‰ (а) и 3 ‰ (б).

Различия достоверны между органами при  $p < 0,05$  (\*), при  $p < 0,01$  (\*\*). Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни

Достоверно зафиксировано увеличение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы ( $p < 0,05$ ) в мышцах и жабрах при увеличении солености до 6‰. Это свидетельствует о том, что фермент обладает высокой чувствительностью к повышению этого фактора в данном диапазоне изменения солености, оказывающего однонаправленное влияние на его активность. Это связано с ролью  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в метаболизме клетки как одного из важнейших участников регуляции водно-солевого баланса (Болдырев и др., 2006).

В жабрах рыб при повышении солености отмечают (Матей, 1996) увеличение числа ионотранспортирующих хлоридных клеток, при этом происходит увеличение суммарного количества сайтов  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы на плазматических мембранах. С этим связано увеличение экспрессии, а также активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы при повышении солености.

Возможно, именно увеличение проницаемости жаберного эпителия с повышением солености приводит к увеличению потока ионов в организм и активации ионотранспортных систем. Основными морфологическими структурами, ответственными за ионную регуляцию у различных видов рыб, являются эпителий жабр, почек и кишечника, органы выделительной системы, особенностью которых является наличие проницаемого эпителия. Из литературных источников известно, что у морских рыб таким органом является кишечник, в котором происходит впитывание проглоченной морской воды и избирательная абсорбция из неё ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , а у пресноводных рыб, которым не нужно пить во-

ду, значительная осморегуляторная нагрузка ложится на почки (Матей, 1996; Виноградов, 2000). Многие исследования говорят о том, что обитающие в пресной воде рыбы характеризуются меньшей проницаемостью эпителия, чем морские, что связано с экономией ионов, в дефиците присутствующих в окружающей среде. Эту же тенденцию демонстрируют эвригалинные рыбы, проницаемость жабр для ионов у которых многократно снижается при переносе из морской воды в пресную (Виноградов, 2000).

При повышении рН среды наблюдалось снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди (рис. 2). Так как ионы  $\text{H}^+$  обмениваются на  $\text{Na}^+$  из внешней среды с участием  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -транспортера, работающего за счет градиента ионов  $\text{Na}^+$ , непосредственно создаваемого  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, поэтому наблюдаемое снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы при повышении рН от 7,0 до 9,0, предположительно, связано со снижением секреции ионов  $\text{H}^+$ , в которой косвенно задействована  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза.

При повышении рН среды наблюдалось снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди (рис. 2). Так как ионы  $\text{H}^+$  обмениваются на  $\text{Na}^+$  из внешней среды с участием  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -транспортера, работающего за счет градиента ионов  $\text{Na}^+$ , непосредственно создаваемого  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, поэтому наблюдаемое снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы при повышении рН от 7,0 до 9,0, предположительно, связано со снижением секреции ионов  $\text{H}^+$ , в которой косвенно задействована  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза.

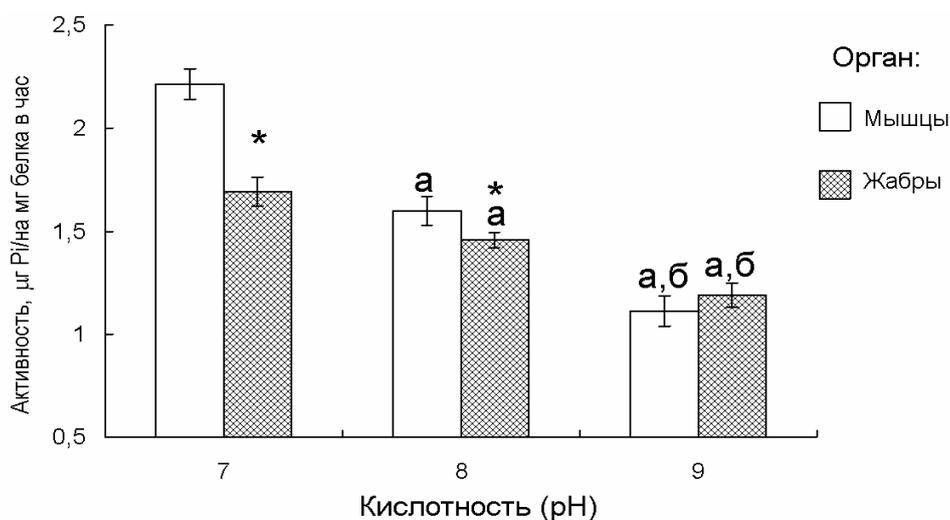


Рис. 2. Влияние кислотности среды на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы ( $M \pm \sigma$ ) в различных органах стерляди. Различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с рН=7 (а) и рН=8 (б).

Различия достоверны между органами при  $p < 0,05$  (\*), при  $p < 0,01$  (\*\*). Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни

Многие исследования демонстрируют повышение активности и экспрессии этого транспортного белка при адаптации рыб к закислению окружающей среды (Choe K.P., 2002; Hirata T., 2003), указывая на важную роль  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменных процессов в регуляции кислотно-щелочного равновесия (Виноградов, 2000).

Также следует отметить, что снижение активности в жабрах идет медленнее, чем в мышцах. Это может быть результатом большей приспособленности жабр к колебаниям внешних факторов среды, что связано с наличием эволюционно выработанных приспособительных реакций к непосредственному контакту с постоянно изменяющейся внешней средой. Существует гипотеза, что решение проблемы регуляции кислотно-щелочного баланса было первейшей задачей жаберного эпителия рыб, заселивших континентальные водоемы, которые, по сравнению с морскими, отличаются значительными колебаниями этого фактора (Виноградов, 2000).

Щелочная среда благоприятствует снижению проницаемости жабр. Это приводит к уменьшению диффузной потери основного внеклеточного  $\text{Na}^+$ , в результате чего общий уровень их потери не будет превышать поглощение (Виноградов, 2000). Вероятно, с замедлением поступления ионов в организм может быть связано понижение уровня активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, в том числе и в мышцах, где при  $\text{pH}=9,0$  ее значение становится меньше, чем в жабрах.

Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей, в основном, выработанным в процессе эволюции физиологическим значением  $\text{pH}$  среды 6,0–8,0.  $\text{pH}$ -оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. При этом некоторые из них выдерживают сильные колебания  $\text{pH}$  и восстанавливают свою активность при возвращении к оптимальным условиям.

Исследуемый диапазон солености до 6‰ и кислотности среды ( $\text{pH}$  от 7,0 до 9,0) находится в пределах адаптивной нормы для стерляди. Полученные данные продемонстрировали, что активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы стерляди находится в прямой зависимости от солености внешней среды (в диапазоне до 6‰) и в обратной зависимости от увеличения  $\text{pH}$  среды (при изменении  $\text{pH}$  от 7,0 до 9,0). Известно, что нарастание количественного значения какого-либо абиотического фактора до определенной критической точки благоприятно для организма, а затем становится отрицательным. Согласно данным Хо-

чачка, при отклонении от оптимальных значений включаются компенсаторные механизмы, снижающие даже стрессовое воздействие факторов (Хочачка, 1994). Раскрытие эффективных механизмов ионной и осмотической регуляции для поддержания устойчивости метаболизма в связи с проблемой возможной акклиматизации стерляди к условиям повышенной солености указывает на приспособительный характер реактивности ферментов активного транспорта ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  при изменении солености и  $\text{pH}$  среды обитания стерляди *Acipenser ruthenus L.* в диапазоне докритических значений.

Большее разнообразие гельминтофауны у моевок и различия в зараженности гельминтами двух типов кайр, ареалы обитания которых совпадают, вызвано их пищевыми предпочтениями. Моевки по типу питания относятся к полифагам, включают в свой рацион кроме рыб беспозвоночных, в частности, моллюсков и ракообразных. В связи с этим у них более широко представлен спектр гельминтофауны. Основу питания тонкоклювых кайр составляет только рыба, а толстоклювые кайры наряду с разными видами рыб потребляют ракообразных. В результате особенностей экологии двух близких видов кайр (Bartlett R. T. et al, 1997), переключения ихтиофагов на измененное питание происходит заражение неспецифическими для данного вида хозяев паразитами.

В проведенном эксперименте выявлено, что в ответ на инвазию паразитами различной таксономической принадлежности, попадающими в организм морских птиц – баренцевоморской моевки и кайр с пищей (рыбой и морскими беспозвоночными) в их печени происходит активация  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы (рис. 3, 4).

В печени моевок (рис. 3) эффект совместной инвазии паразитами семейств *Dilepididae* и *Tetrabothriidae* оказывается более выраженным по сравнению с влиянием отдельного (синглетного) заражения паразитами указанных семейств.

У тонкоклювых и толстоклювых кайр паразитарная инвазия также вызывает в печени рост активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы (рис. 4).

У толстоклювой кайры наибольший эффект вызывало заражение цестодами *Hymenolepididae*. Возрастание активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в печени морских птиц при зараженности паразитами разных семейств позволяет подтвердить участие данного фермента в ответной реакции плазматических мембран клетки. Реактивность ферментов активного транспорта ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в ответ на па-

разитарную инвазию зависит от вида организма – паразита. Показано, что один из механизмов адаптации организма хозяина к воздействию представителей различных семейств паразитов связан с включением механизмов, повышающих прони-

цаемость мембран для ионов и различных метаболитов. Направленность и амплитуда изменения изученных показателей зависела от вида гельминта, особенностей экологии и специфичности хозяина.

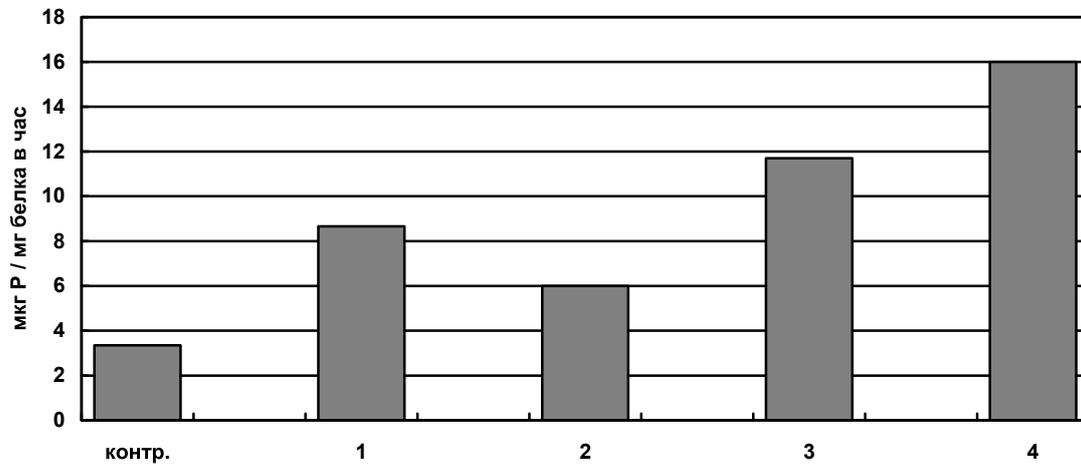


Рис. 3. Активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы (мкг фосфора/мг белка в час) в печени моськи при инвазии различными семействами паразитов: 1 – *Dilepididae*; 2 – *Tetrabothriidae*; 3 – смешанное *Dilepididae* и *Tetrabothriidae*; 4 – Трематоды

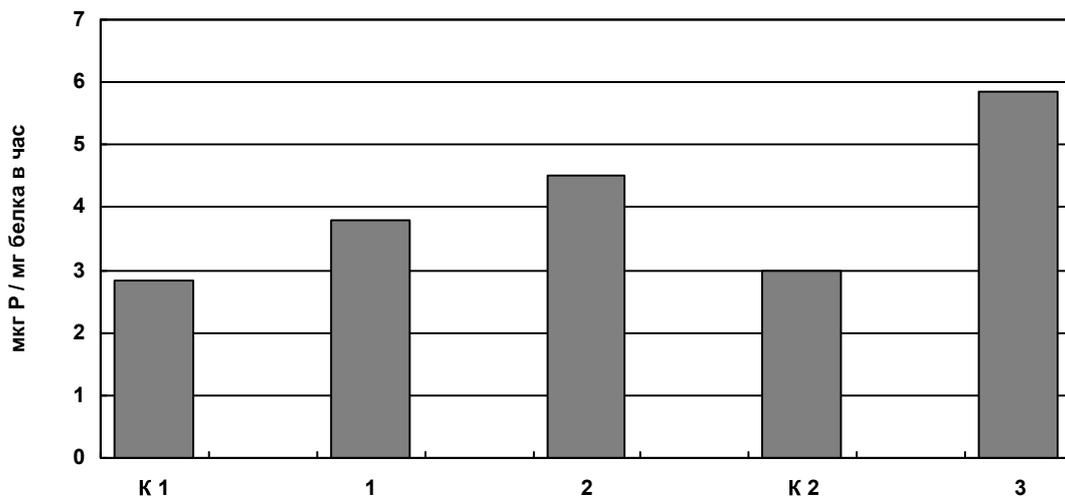


Рис. 4. Активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы (мкг фосфора/мг белка в час) в печени кайр (К 1 – толстоклювые кайры, контроль; К 2 – тонкоклювые кайры, контроль) при инвазии различными семействами паразитов (1, 2 – толстоклювые кайры; 3 – тонкоклювые кайры): 1 – *Tetrabothriidae*; 2 – *Hymenolepididae*; 3 – *Dilepididae*

Изменение биохимического статуса исследуемых организмов в различных экологических ситуациях включают в себя изменение метаболических функций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, направленных на компенсацию возможных негативных последствий таких воздействий, чтобы сохранить целостность макромолекул и поддержать

регуляторные механизмы метаболизма на уровне, необходимом для осуществления жизненно важных функций организма.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-0140а и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4

## Литература

- Болдырев А. А.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза. Свойства и биологическая роль. Соросовский образовательный журнал, № 4, 1998. С. 2–10.
- Болдырев А. А., Кяйвярйянен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология. Петрозаводск: Из-во КарНЦ РАН, 2006. 226 с.
- Виноградов Г. А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
- Высоцкая Р. У. Сравнительная биохимия гельминтов рыб / Р. У. Высоцкая, В. С. Сидоров – Л.: «Наука», 1989. – 151 с.
- Елаев Н. Р., Семенов Е. В. Изменение активности мембранных АТФаз мозга при воздействии холино- и адrenomиметических веществ // Биохимия. 1974. Т. 39, вып. 3. С. 636–640.
- Куклин В. В., Куклина М. М. Гельминты птиц Баренцева моря: фауна, экология, влияние на хозяев Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2005. – 299 с.
- Матей В.Е. Жабры пресноводных костистых рыб. Морфофункциональная организация, адаптация, эволюция. – Санкт-Петербург: Наука, 1996. – 204 с.
- Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов. Л., 1974. – 230 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 396 с.
- Barrett R. T., Anker-Nilssen M T., Krasnov Yu.V. Can northern razor-bill *Alca torda* be identified by their measurements? / R. // Var. Ornithol. – 1997. – Vol. 25. – P. 5–8.
- Bradford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // M.M. Bradford.// Anal Biochem. – 1976. – № 10 – P. 491–497.
- Choe K.P., Morrison-Shetlar A.I., Wall B.P., and Claiborne J.B. Immunological detection of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchangers in the gills of a hagfish, *Myxine glutinosa*, an elasmobranch, *Raja erinacea*, and a teleost, *Fundulus heteroclitus*. Comp Biochem Physiol A Physiol 131: 375–385, 2002.
- Hirata T., Kaneko T., Ono T., Nakazato T., Furukawa N., Hasegawa S., Wakabayashi S., Shigekawa M., Chang M.H., Romero M.F., Hirose S. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3,5 lake. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284: R1199–R1212, 2003.

### ROLE OF $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPASE IN THE BIOCHEMICAL MECHANISM OF ADAPTATION TO ABIOTIC AND BIOTIC ENVIRONMENTAL FACTORS

E.I. Kaivarainen<sup>1</sup>, E.V. Borvinskaya<sup>1</sup>, G. G. Serpunin<sup>2</sup>, M.M. Kuklina<sup>3</sup>, N.N. Nemova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia, e-mail: hela\_kaiv@mail.ru*

<sup>2</sup> *Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia*

<sup>3</sup> *Murmansk Marine Biological Institute Kola Scientific Centre of RAS, Murmansk, Russia*

The lead experiment has shown reactivity of enzymes of osmoregulation  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase to changing ecological factors of environment, such as increase of salinity and pH, that underlies the adaptive reactions developed at eurygallinic kinds of fishes to

which the sterlet is concerned. Also it was investigated the influence of different kind of helminthes on this biochemical parameter of birds and it was shown that the permeability of membranes for ions and various metabolites was higher than in control bird group.