

Г. Е. Киричук,
кандидат биологических наук, доцент;
А. П. Стадниченко,
доктор биологических наук, профессор;
Л. Д. Иваненко,
старший преподаватель;
В. К. Гирин,
старший преподаватель;
Г. В. Муж,
кандидат биологических наук, доцент;
М. С. Памирский,
старший преподаватель
(Житомирский государственный университет)

Влияние малеиновой кислоты на физико-химические свойства гемолимфы *Planorbarius purpura* (Mollusca: Bulinidae), инвазированных трематодами (Echinostomatidae)

*Дослідженням одночасного впливу трематодної інвазії та різних концентрацій малеїнової кислоти встановлено, що вона для *Planorbarius purpura* є отрутою помірнотоксичної дії. За концентрацій 1, 10 та 100 мг/л токсиканту статистично достовірно змінюються фізико-хімічні властивості гемолимфи: підвищуються вміст гемоглобіну в гемолімфі, забезпеченість їм тотальної маси та маси м'якого тіла.*

Одним из компонентов органического загрязнения водоемов (особенно поли- и α -мезосапробных) является малеиновая кислота, поступающая в них с неочищенными или недостаточно очищенными стоками различных химических предприятий (производство синтетических высушающих масел, пластификаторов, янтарной и молочной кислот и др.). Другим источником поступления значительных ее количеств (при высокой плотности жизни) в водные бассейны являются различные гидробионты, в организме которых в цикле Кребса образуется фумаровая кислота, легко превращающаяся в кислоту малеиновую. Влияние последней на состояние моллюсков в норме и при инвазии их трематодами по настоящее время не исследовалось.

Материал и методы исследований

246 экз. катушек пурпурных *Planorbarius purpura* (O.F.Müller, 1774), собранных в правом притоке Припяти (р.Уборть, Житомирская обл., Украина) в сентябре 1999 г. Моллюски были спонтанно инвазированы редиями и церкариями трематоды *Cotylurus cognatus* Rud., локализованными в гепатопанкреасе хозяев. Экстенсивность инвазии – 81%, ее интенсивность преимущественно слабая и умеренная (очаги поражения небольшие и весьма удаленные друг от друга). Общие сведения о материале исследования представлены в табл.1.

Таблица 1.

Общие данные о материале исследований

Инвазия	Диаметр раковины, мм	Общая масса тела, мг	Масса мягкого тела, мг	Объем гемолимфы, мг
Контроль				
Нет	26.50±0.592	3362±151.00	1132±53.95	0.82±0.0375
Есть	24.80±0.390	3089±111.20	995±36.50	0.75±0.0377
1 мг/л				
Нет	26.38±0.793	3631±131.66	1467±45.83	0.92±0.0623
Есть	25.83±0.287	3444±61.43	1358±24.63	0.88±0.0078
10 мг/л				
Нет	26.15±0.500	3580±161.27	1393±69.00	0.76±0.0773
Есть	25.77±0.329	3440±111.60	1345±41.50	0.80±0.0371
100 мг/л				
Нет	26.09±0.473	3513±142.02	1254±69.97	0.75±0.0871
Есть	26.52±0.303	3479±107.61	1235±39.50	0.70±0.0337

Токсикологические опыты поставлены по В.А. Алексею [1]. Первым из них (ориентировочным) определены основные токсикологические показатели: МПК (LC_{50})=1 и ЛК₁₀₀ (LC_{100})=1000 мг/л. Значение ЛК₅₀ (LC_{50}) = 100 мг/л установлено графическим методом [2]. Во втором (основном) опыте использованы растворы малеиновой кислоты концентрацией 1, 10, 100 мг/л, приготовленные на дехлорированной отстаиванием (1 сут) водопроводной воде (температура 18-21°, рН= 7.2-7.5, содержание кислорода 8.6-8.9 мг/л).

Продолжительность опыта – 2 сут, причем после первых суток экспозиции «отработанные» среды заменяли свежеприготовленными. Все опыты сопровождались контролем.

Гемолимфу получали методом прямого обескровливания. Объем её определяли с помощью диабетического шприца, рН – потенциометрически (ориентировочно – индикатором "Рифан"). Уровень содержания гемоглобина (Hb) в гемолимфе устанавливали солянокисло-гематиновым методом по Сали в модификации И.О. Аляриной [3].

Трематодную инвазию выявляли путем микроскопирования временных гистологических препаратов, изготовленных из тканей гепатопанкреаса. Видовую принадлежность паразитов выявляли исключительно на живом материале.

Результаты обработаны методами вариационной статистики по Г.Ф. Лакину [4]. Приняты такие критерии вероятности сдвига [5]: 1) для "жестких" показателей (V до 10%) – 90%; 2) для пластичных (V до 50%) – 95%; 3) для малоинформативных (V более 50%) – 99%. К первой группе отнесена активная реакция гемолимфы, ко второй – содержание в ней гемоглобина.

Результаты и их обсуждение

Согласно классификации токсикологических веществ по интенсивности их воздействия на организмы [6] малеиновая кислота является ядом локального действия. Как и другие органические кислоты, для моллюсков – это яд умереннотоксического действия. При 1 мг/л ее в среде у значительной части особей резко повышается двигательная активность животных, которые устремляются вверх по стенкам аквариума, стремясь покинуть затравленную среду.

Реакция избегания – одна из форм оборонительного поведения этих животных, направленная на ограничение их контакта с токсикантом. При этом незараженные особи, как правило, успешно достигают уреза воды и, преодолев его, располагаются на стенках аквариума. Попытки же зараженных животных (при средней, а особенно при тяжелой степени инвазии) в этом отношении часто оказываются безуспешными. Эти моллюски в течение непродолжительного времени полностью обездвиживаются, причем одни из них остаются на стенках аквариума, другие же опускаются на его дно, где и пребывают в полной неподвижности. При повышении концентрации малеиновой кислоты в среде до 10 мг/л количество животных, у которых проявляется реакция избегания, возрастает, а при 100 мг/л токсиканта она регистрируется у всех, без исключения, подопытных катушек. При росте концентрации малеиновой кислоты в пределах 1 – 100 мг/л промежуток времени, через который проявляется эта реакция, сокращается прямо пропорционально концентрации токсиканта.

При 1 – 10 мг/л малеиновой кислоты в среде происходит стимулирование слизоотделения кожными железами. Это быстрая физиологическая реакция защитного характера, ограничивающая доступ токсического вещества к кожному эпителию и, следовательно, уменьшающая возможность диффундирования его внутрь организма. Однако её положительное действие возможно только до тех пор, пока слой слизи, покрывающий тело моллюсков, не становится слишком толстым. В последнем случае ослизнение резко ограничивает возможность кожного дыхания, а у этих животных, как известно [7], 30–50% кислорода, необходимого для их нормальной жизнедеятельности, поступает в их организм именно через кожу. В растворах, содержащих 100 мг/л малеиновой кислоты, наблюдаются мозаичные деструктивные изменения кожного эпителия вплоть до его полного разрушения с образованием кровоточащих язв (сначала точечных, затем обширных). Последние наиболее многочисленны в околопупальцевых участках головы, на подошве, по краю дыхательного отверстия, а также в полости легкого и на адаптивной жабре. Изъязвление кожных покровов и выстилки легкого, как правило, происходит одновременно у незараженных катушек и у особей со слабой интенсивностью инвазии и значительно раньше при тяжелой инвазии.

Повреждение кожных покровов обычно совпадает по времени с развитием у моллюсков положительного водного баланса, наблюдающегося у всех подопытных животных – как незараженных, так и инвазированных трематодами. На это указывает значительное возрастание массы их тела (общей и мягкого тела) (табл. I). Уже в слабом растворе малеиновой кислоты (1 мг/л) мягкое тело у незараженных катушек обводняется на 30, а у зараженных – на 36,5 % (P=99,9 %). Различия между этими двумя группами животных обусловлены скорее всего тем, что моллюски второй группы подвергаются одновременному воздействию двух повреждающих факторов – токсиканта и паразитов и, будучи ослабленными инвазией, не в состоянии противостоять вредному воздействию токсической среды в такой мере, как это имеет место у незараженных животных.

Визуально положительный водный баланс выражается у задействованных в опытах катушек развитием у них сначала пастозности, а затем разлитого отека ноги и головы, увеличивающимися при этом в объеме в 1,5 – 2,5 раза и вывисающими из устья раковины (реакция выпадения). Параллельно с обводнением тела происходит возрастание объема гемолимфы. Опять-таки эта патология ярче выражена у зараженных катушек риска. Так, если у свободных от инвазии животных, подвергнутых воздействию на них малеиновой кислотой в концентрации 1 мг/л, объем гемолимфы в сравнении с контролем возрастает на 12%, то у инвазированных особей этот показатель превышает 17% (P = 99,9%).

У незараженных катушек уровень содержания гемоглобина в плазме гемолимфы в среднем составляет $0,72 \pm 0,05$ г%, (по показателям, установленные для *Planorbarius* из разных точек его ареала) [8-11]. Размах колебания обсуждаемого показателя в границах популяций относительно невелик – 0,4–1,5 г%. Активная реакция гемолимфы кислая (табл.2) при амплитуде колебания ее от кислой (рН 4) до слабокислой (рН6).

Таблица 2.

Влияние трематодной инвазии и малеиновой кислоты на активную реакцию (рН) гемолимфы *P. purpura*

Инвазия	Концентрация токсиканта, мг/л			
	0	1	10	100
Нет	4.50 ± 0.111	4.07 ± 0.077	4.40 ± 0.149	4.40 ± 0.228
Есть	4.40 ± 0.101	4.14 ± 0.056	4.30 ± 0.134	4.40 ± 0.083

У особей, инвазированных *S. cognatus*, концентрация гемоглобина в гемолимфе составляет $0,79 \pm 0,03$ г% при одинаковом размахе колебания значения этого фактора со свободными от паразитов особями. Концентрация в ней водородных ионов кислая при размахе колебания от кислой (рН 3) до слабокислой (рН 6). Как видим, статистически достоверные различия между незараженными и инвазированными трематодами особями контрольной группы отсутствуют. Однако существенные различия имеются между ними по обеспеченности гемоглобином общей массы и массы их мягкого тела. Так, обеспеченность им мягкого тела инвазированных трематодами особей в 1,2 раза выше такового незараженных катушек. Это свидетельствует о том, что у первых из них уровень мобилизации углеводов (как основного энергетического субстрата) ниже, чем у вторых. А это, в свою очередь, указывает на напряженность защитно-приспособительного процесса, направленного на противодействие повреждающему влиянию паразитного фактора. Тем не менее зараженные животные, пребывая в среде, содержащей 1 мг/л малеиновой кислоты, оказываются способными противостоять её патогенному воздействию. Об этом свидетельствует резкое снижение обеспеченности гемоглобином массы их мягкого тела, такое же, как и у незараженных животных (на 21 – 23%).

В слабом растворе меланиновой кислоты (1 мг/л) изменения внутренней среды катушек состоят в подкислении гемолимфы и в повышении содержания в ней уровня гемоглобина. Сдвиг влево в системе «гемоглобин-оксигемоглобин» свидетельствует о замедлении аэробного обмена, который прямо пропорционален возрастанию концентрации гемоглобина (у незараженных особей на 15,3, у зараженных – на 27,1%). Сдвиг активной реакции гемолимфы в кислую сторону – следствие разбалансировки её буферных систем. Интересно, что повышение концентрации токсиканта в среде до 10 и 100 мг/л не влечет за собой дальнейшего усугубления вышеупомянутых сдвигов физико-химических свойств гемолимфы катушек (табл.3).

Таблица 3.

Влияние трематодной инвазии и малеиновой кислоты на содержание гемоглобина и обеспеченность им тела *Planorbarius purpura*

Инвазия	Содержание гемоглобина, г%	Обеспеченность гемоглобином общей массы тела, г/кг	Обеспеченность гемоглобином мягкого тела, г/кг
Контроль			
Нет	0.72 ± 0.048	2.29 ± 0.185	6.77 ± 0.532
Есть	0.79 ± 0.031	2.68 ± 0.136	8.35 ± 0.413
1 мг/л			
Нет	0.83 ± 0.058	2.31 ± 0.152	5.35 ± 0.352
Есть	0.89 ± 0.039	2.37 ± 0.115	6.55 ± 0.274
10 мг/л			
Нет	0.92 ± 0.046	2.64 ± 0.178	6.85 ± 0.499
Есть	0.86 ± 0.033	2.60 ± 0.121	6.58 ± 0.271
100 мг/л			
Нет	0.91 ± 0.049	2.09 ± 0.157	6.25 ± 0.439
Есть	0.82 ± 0.020	1.92 ± 0.104	6.64 ± 0.302

В границах указанных концентрацией малеиновой кислоты активная реакция гемолимфы и содержание в ней гемоглобина, равно как и обеспеченность им тотальной массы и таковой мягкого тела, поддерживаются на стабильном уровне, характерном для моллюсков, находящихся в слабом растворе токсиканта (1 мг/л). Это, однако, касается только тех особей, которые выживают к моменту завершения эксперимента, пребывая на депрессивной фазе патологического процесса¹. При 10 мг/л малеиновой

¹ Деление патологического процесса, обусловленного отравлением, на фазы принято по Е.А. Веселову [12].

кислоты в среде смертность катушек составляет 25, а при 100 мг/л – 50 %. У животных, не доживающих до конца эксперимента, процесс отравления является весьма быстротечным: за 1-1.5 сут. после кратковременной депрессивной фазы у них быстро следуют одна за другой сублетальная и летальная фазы. На сублетальной фазе отравления происходит резкое подкисление гемолимфы (вплоть до pH = 3) и повышение содержания в ней гемоглобина (до 1.05-1.2 г%). Эти изменения намного ярче выражены у инвазированных особей (особенно при тяжелой инвазии) и наблюдаются у них, как правило, раньше по времени.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.А. Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журн. – 1981. – Т.17, №3. – С.92 – 100.
2. Прозоровский В.Б. О выборе метода построения кривой летальности и определения средней летальной дозы // Журн. общ. биол. – 1960. – Т.21, №3. – С. 221 – 228.
3. Алякринская И.О. Количественная характеристика гемолимфы и гемоглобина роговой катушки *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) // Зоол. журн. – 1970. – Т.49, вып.3. – С. 349 – 354.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973. – 343 с.
5. Шефтель В.О., Сова Р.Е. Критерий надежности как функция биологической значимости и вариабельности признака / Применение математических методов оценки и прогнозирования реальной опасности накопления пестицидов во внешней среде и организме. Киев: АСХН УССР. – 1976. – С.37 – 39.
6. Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. М.: Колос, 1971. – 247 с.
7. Gones J.D. The function of the respiratory pigments of invertebrates // Probl. Biol. – 1963. – Vol.1. – P.9 – 90.
8. Borden M.A. A study of the respiration and of the function of haemolymph in *Planorbis corneus* and *Arenicola marina* // J. Marine Biol. Assoc. U.K.. – 1931. – Vol. 17. – P. 709 – 735.
9. Стадниченко А.П., Иваненко Л.Д., Бургомистренко Л.Г. Изменение физико-химических свойств гемолимфы *Planorbarius corneus* (Gastropoda: Pulmonata) при инвазии паразитами *Cotylurus cotutus* (Trematoda, Strigeidae) // Паразитология. – 1980. – Т.14, вып. 1. – С.66 – 70.
10. Стадниченко А.П., Иваненко Л.Д., Василенко О.Ф., Зинич М.М., Вишневская А.Е., Киричук Г.Е., Мыслинская Л.Н., Семений Т.А. Влияние разных концентраций сульфата цинка на физико-химические свойства гемолимфы *Planorbarius* (Mollusca: Bulinidae) в норме и при инвазии трематодами // Паразитология. – 1993. – Т.27, вып. 5. – С. 66 – 70.
11. Стадниченко А.П., Иваненко Л.Д., Слестенко Н.Н., Киричук Г.Е., Антошук Д.А., Баранюк Р.С., Криская Е.В., Мошковская Т.А., Радкевич О.С. Влияние нитрата аммония на физико-химические свойства гемолимфы катушек *Planorbarius corneus* (Mollusca: Bulinidae) инвазированных трематодами (Echinostomatidae) // Паразитология. – 1999. – Т.33, вып.1. – С. 26 – 31.
12. Веселов Е.А. Основные фазы действия токсических веществ на организм // Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. по вопр. возн. токсикол. М.:Наука, 1968. – С. 15 – 16.

*Киричук Г. Е., Стадниченко А. П., Иваненко Л. Д., Гирич В. К., Муж Г. В., Памирский М. С. Влияние малеиновой кислоты на физико-химические свойства гемолимфы *Planorbarius purpura* (Mollusca: Bulinidae), инвазированных трематодами (Echinostomatidae).*

*Исследованием одновременного воздействия трематодной инвазии и различных концентраций малеиновой кислоты установлено, что она для *Planorbarius purpura* является ядом умереннотоксического действия. При 1, 10 и 100 мг/л токсиканта статистически достоверно изменяются физико-химические свойства гемолимфы: повышаются содержание гемоглобина в гемолимфе, обеспеченность им тотальной массы, и таковой мягкого тела.*

*Kyrychuk G. Ye., Stadnychenko A. P., Ivanenko L. D., Hyryn V. K., Muzh G. V., Pamirsky M. S. The influence of maleic acid on the lymph physico-chemical properties in *Planorbarius purpura* (Mollusca: Bulinidae) invaded with trematodes (Echinostomatidae).*

*The study of the synchronous influence of trematode invasion and maleic acid in different concentrations proves it to be a moderate toxicant for *Planorbarius purpura*. Toxicant concentrations of 1, 10 and 100 mg/l change obviously haemolymph physico-chemical properties: the haemoglobin content in haemolymph increases as well as in the total mass and in the soft body mass.*