

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ ТВАРИН

УДК 594.381.5: 574.64

Г.Є. КИРИЧУК, д. б. н., проф.,
Житомирський державний університет імені Івана Франка,
вул. В. Бердичівська, 40, Житомир, 10008, Україна,
e-mail: kyrychuk@zu.edu.ua
ORCID: 0000-0002-1059-2834

Л.В. МУЗИКА, к. б. н., доцент
Житомирський державний університет імені Івана Франка,
вул. В. Бердичівська, 40, Житомир, 10008, Україна,
e-mail: lidiya.muzyka@ukr.net
ORCID: 0000-0001-7752-7853

М.М. МИКУЛА, к. мед. н., доц.,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця,
бульвар Тараса Шевченка, 13, Київ, 01601, Україна,
e-mail: mykula.nmu@gmail.com
ORCID: 0000-0002-9752-8711

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ВМІСТ β -КАРОТИНУ В ОРГАНІЗМІ *Lymnaea stagnalis*

Досліджено вплив іонів кадмію (Cd^{2+} , 0,01 мг/дм³), цинку (Zn^{2+} , 0,02 мг/дм³), купруму (Cu^{2+} , 0,002 мг/дм³), плюмбуму (Pb^{2+} , 0,02 мг/дм³), хрому (Cr^{3+} , 0,01 мг/дм³), мангану (Mn^{2+} , 0,02 мг/дм³) та нікелю (Ni^{2+} , 0,02 мг/дм³) на вміст β -каротину в гемолімфі, гепатопанкреасі, мантії та нозі *Lymnaea stagnalis*. Встановлено вміст обговорюваного каротиноїду в тканинах (органах) молюсків за різної експозиції (2, 7, 14 та 21 доба) тварин у токсичному середовищі. Показано, що зміни показників характеризуються нелінійною динамікою, що пов'язано із природою та специфічністю дії досліджуваних іонів, тривалістю експозиції тварин в токсичних розчинах та метаболічними особливостями органів та тканин молюсків.

Встановлено, що дія іонів Cr^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} та Cd^{2+} протягом 2 діб призводить до збільшення вмісту β -каротину у гемолімфі *L. stagnalis*, що вказує на розвиток миттєвої, спрямованої на підтримку гомеостазу, відповіді цих тварин на токсичну дію. У гепатопанкреасі, мантії та нозі *L. stagnalis* іони хрому (експозиція 2 доби) обумовлювали збільшення показників в 1,43—2,05 рази ($p \leq 0,05$ —0,001), а динаміка вмісту β -каротину за інкубації молюсків у розчинах усіх інших досліджених нами іонів була органоспецифічною.

Виявлено, що при пролонгуванні впливу Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} та Zn^{2+} до 14 діб посилюється їх інгібуючий вплив на метаболізм *L. stagnalis*, що проявляється зменшенням вмісту β -каротину у всьому їх тілі на 12,20—66,91 % (виняток — ге-

Ц и т у в а н н я: Киричук Г.Є., Музика Л.В., Микула М.М. Особливості впливу низьких концентрацій іонів важких металів на вміст β -каротину в організмі *Lymnaea stagnalis*. Гідробіол. журн. 2024. Т. 60, № 2. С. 79—94.

ISSN 0375-8990. Гідробіологічний журнал. 2024. 60(2)

79

молімфа тварин, у якій зафіксовано суттєве зростання показників за дії Cr^{3+} (в 3,22 раза ($p \leq 0,001$) та нога, у якій відмічено рівень контролю за дії іонів нікелю).

Проведений ієрархічний кластерний аналіз, який дозволив виявити закономірності впливу іонів ВМ (експозиція 2, 7, 14 та 21 доба) на вміст β -каротину у гемолімфі, гепатопанкреасі, мантиї та нозі *L. stagnalis*.

Ключові слова: β -каротин, важкі метали, антиоксидантна активність, окислювальний стрес, метаболічна адаптація, прісноводні молюски.

В результаті антропогенної діяльності серйозною екологічною проблемою на сьогодні є забруднення природних вод хімічними сполуками, що призводить до формування якісно нових умов середовища існування гідробіонтів та впливає на існування не лише окремих видів, популяцій, але і екосистеми загалом. Серед екотоксикантів пріоритетною групою є важкі метали (ВМ), які характеризуються хімічною стійкістю, мають високу біоаккумулятивну здатність, можуть мігрувати ланцюгами живлення та накопичуватись на всіх його рівнях [3, 7, 15, 16, 18, 25]. Іони ВМ є незамінними для життєдіяльності водних тварин, відіграючи важливу роль в метаболічних процесах, будучи компонентами ферментів та білків, однак за більш високих їх концентрацій стають токсичними та викликають порушення на різних рівнях організації живої матерії [3, 12].

Однією з причин токсичної дії іонів ВМ на організм гідробіонтів є індукований ними окислювальний стрес, який виникає внаслідок утворення активних форм кисню (АФК), котрі є проміжними продуктами неповного відновлення кисню в дихальному ланцюзі. АФК мають високу хімічну активність, здатні ініціювати швидкі ланцюгові реакції окислення субстратів з утворенням продуктів їх модифікації, що призводить до дисбалансу окисно-відновного стану клітини, пошкодження основних молекул та надмолекулярних клітинних структур, а також розвитку різних патологічних процесів [14, 16, 23].

Відомо, що одним із критеріїв оцінки токсичності навколишнього середовища (особливо окислювального пошкодження, викликаного хімічними агентами) є баланс між прооксидантними ендогенними й екзогенними чинниками та антиоксидантною системою організму [14, 17, 24].

Одним з елементів неферментативної антиоксидантної системи гідробіонтів є каротиноїдні пігменти, які здатні нейтралізувати вільні радикали й синглетний кисень та виступати ефективними антиоксидантами, попереджуючи окислювальне пошкодження клітини [8, 10, 16, 26]. Окрім цього, каротиноїдні пігменти підвищують ефективність імунної реакції безхребетних тварин та стимулюють компоненти їх вродженого імунітету [21]. У зв'язку з цим, каротиноїди є одним із чинників, що підвищує токсикорезистентність водних організмів, забезпечує їх біохімічну адаптацію до змінюваних чинників водного середовища, а також є одним з критеріїв оцінки екотоксикологічного стану та металічного забруднення гідроценозів [6].

Зважаючи на все зазначене, актуальним є дослідження впливу іонів ВМ на вміст β -каротину в організмі прісноводних молюсків, які, завдяки

ряду особливостей, є унікальною моделлю для дослідження механізмів порушень гомеостазу, викликаних токсичними агентами. Нами встановлено, що іони Cd^{2+} (0,5 та 2 ГДК) викликають дозо- та часозалежні зміни вмісту β -каротину в організмі *Lymnaea stagnalis*, що виступає адаптивною відповіддю тварини, спрямованою на підтримку її функціонування за токсичної дії [3]. У зв'язку з цим, виникла необхідність проведення комплексного дослідження, яке б дозволило змодельовати вплив найбільш поширених іонів ВМ гідроценозів Житомирського Полісся на вміст обговорюваного каротиноїду в тканинах і органах *L. stagnalis*.

Попередніми нашими дослідженнями встановлено, що вплив допорогової концентрації (0,5 ГДК) іонів ВМ на вміст β -каротину в організмі *L. stagnalis* є багатовекторним і має регуляторно-токсичний принцип дії [13], що обумовило доцільність вивчення динаміки вмісту обговорюваного каротиноїду в тканинах і органах цих молюсків при збільшенні концентрації токсикантів.

Матеріал і методика досліджень

Матеріал: 640 екз. *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), зібраних у вересні — листопаді. Тварин очищували від обростань і донних відкладів і піддавали аклімації протягом 14 діб. Для дослідження відібрано однотипових неінвазованих особин зі стандартними розмірно-ваговими характеристиками ($m = 5,18 \pm 1,22$ г; $l = 44,8 \pm 3,26$ мм; $h = 25,91 \pm 3,46$ мм). Розмірно-вагові характеристики визначали штангенциркулем та електронними вагами (WPS 1200) з точністю до 0,01 г.

Для уникнення взаємовпливу катіону та аніону в якості токсикантів використано $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $PbCl_2$, $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$, $ZnCl_2$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ та $Cr(CH_3COO)_3$ з маркуванням «чда». Розрахунок концентрацій токсикантів проведено на катіон. В основному токсикологічному експерименті використано концентрації іонів кадмію (Cd^{2+} , 0,01 мг/дм³), цинку (Zn^{2+} , 0,02 мг/дм³), купруму (Cu^{2+} , 0,002 мг/дм³), плюмбуму (Pb^{2+} , 0,02 мг/дм³), хрому (Cr^{3+} , 0,01 мг/дм³), мангану (Mn^{2+} , 0,02 мг/дм³) та нікелю (Ni^{2+} , 0,02 мг/дм³), які відповідали 2 ГДК_{рибогосп.} [2]. Експозиція — 2, 7, 14 та 21 доба. Розчини готували на дехлорованій воді (pH = 7,2—7,5; T = 18—20 °C; вміст кисню 8,5—8,9 мг/дм³). Зміну токсичного середовища для видалення метаболітів тварин і підтримки постійної концентрації токсикантів проводили через кожні 24 год. Інкубаційним середовищем для контрольної групи молюсків слугувала водопровідна дехлорована вода без додавання токсиканту.

В експерименті використано гепатопанкреас, мантию та ногу, яку отримували, анатомуючи тварин, а також гемолімфу, отриману методом прямого знекровлення. Органи гомогенізували і проводили екстракцію гексаном (1:4). Сумарний вміст відновленого β -каротину визначали за методикою [22]. Всього виконано 2560 біохімічних аналізи.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими статистичними методами із застосуванням t -критерію Ст'юдента. Розбіжності вважали статистично вірогідними при $p \leq 0,05$ —0,001.

Кластерний аналіз проведено методом деревоподібної кластеризації (ієрархічна кластеризація, tree clustering) з використанням пакету програми Statistica 10 [5].

У процесі виконання експерименту норми біоетики порушені не були.

Результати досліджень та їх обговорення

Відомо, що іони ВМ, які є невід'ємними компонентами гідроекосистем, характеризуються різною хімічною активністю, відрізняються рівнем проникності в клітини поверхневих та внутрішніх органів та ступенем накопичення в тканинах, у зв'язку з чим можуть відігравати подвійну роль, викликаючи окислювальне пошкодження клітинних компонентів гідробіонтів, або ж виступаючи важливим вторинним месенджером для активації їх системи захисту [1, 4, 16, 19].

Відомо, що компенсаторно-адаптивна відповідь водних організмів на дію токсикантів визначається швидкістю і механізмом надходження металу в організм, ступенем його накопичення в метаболічно активних структурах, а також залежить від фізико-хімічних властивостей та фізіологічної ролі металу в організмі [1].

Досліджувані нами іони ВМ відрізняються рядом вище наведених ознак, у зв'язку з чим є неоднаково токсичними для *L. stagnalis* та викликають різного ступеня розвиток патологічних та компенсаційних змін у вигляді модифікацій кількісного вмісту β -каротину в їх тканинах і органах.

В результаті проведених досліджень встановлено, що вміст β -каротину в організмі *L. stagnalis* за дії Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} (2 ГДК) характеризується досить нелінійною динамікою, пов'язаною із природою та специфічністю дії досліджуваних іонів, тривалістю експозиції тварин в токсичних розчинах (2, 7, 14, 21 доба) та метаболічними особливостями досліджуваних органів та тканин (рис. 1).

З'ясовано, що 48-годинна експозиція *L. stagnalis* у токсичних розчинах майже всіх досліджених нами іонів призвела до збільшення вмісту β -каротину у їх гемолімфі, що, імовірно, вказує на розвиток миттєвої відповіді тварин на токсичну дію та модуляцію наявних в біосистемі ресурсів, що є необхідним для життєзабезпечення та підтримання їх стійкості [1].

Таке збільшення показників також пояснюється здатністю каротиноїдів гемолімфи депонувати кисень, що впливає на інтенсивність вільнорадикального окислення, викликаного досліджуваними іонами.

Значне відхилення від контролю (на 81,48 %) ($p \leq 0,01$) зафіксовано за дії іонів Cr^{3+} . Хром, як відомо, є біофільним мікроелементом та проявляє біологічну роль в екосистемах залежно від ступеня окислення. У природних умовах найбільш стійким є йон Cr^{3+} , який чинить генотоксичну дію та може викликати окислювальне пошкодження клітини різними молекулярними механізмами. Тому, таке збільшення β -каротину за дії Cr^{3+} може свідчити про активацію захисних сил організму молюсків у від-

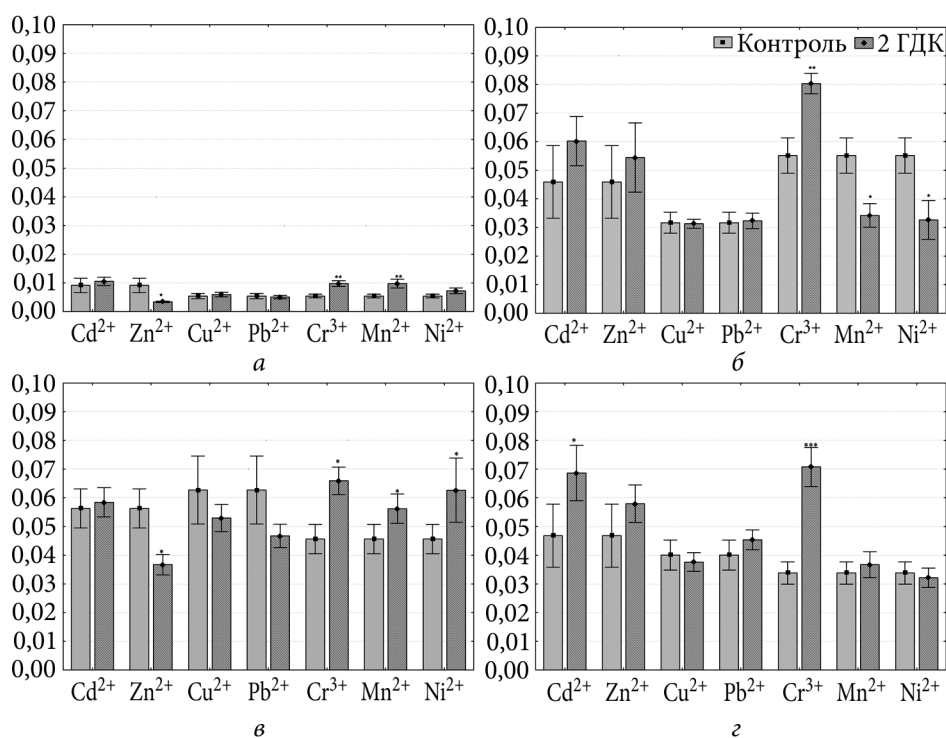


Рис. 1. Вплив іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину ($M \pm m_x$, $n = 10$) в організмі *L. stagnalis* (експозиція 2 доби): а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантія; г — нога. Тут і на рис. 2—4: по осі абсцис — використані в дослідженні іони, по осі ординат — вміст β -каротину (мг/г сирової тканини); * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

повідь на токсичний вплив, адже посилення прооксидантних процесів індукує ферментативну антиоксидантну активність та викликає підвищення рівня неферментативних антиоксидантів в клітині [8].

Збільшення показників вмісту β -каротину у гемолімфі відмічено за дії іонів Cu²⁺ (на 11,11 %), Cd²⁺ (на 16,48 %), Ni²⁺ (на 33,33 %) та Mn²⁺ (на 81,48 %). Водночас, іони Zn²⁺ обумовлюють зменшення вмісту β -каротину (на 62,6 %) ($p \leq 0,05$), що пояснюється, ймовірно, їх участю в метаболізмі ретинолу в організмі гідробіонтів. Окрім цього, цинк має антиоксидантні властивості та входить до складу ключового антиоксидантного ензиму супероксиддисмутази (СОД), у зв'язку з чим рівень ПОЛ, очевидно, у дослідній групі є нижчим порівняно з контрольною. Саме тому, за дії іонів Zn²⁺ не виникає необхідності у вилученні β -каротину з депо та надходження його в тканину для забезпечення АО захисту.

Іони плумбуму не призводили до змін кількісного вмісту β -каротину в гемолімфі *L. stagnalis*, адже цей ВМ є типовим токсикантом та не бере участі у фізіологічних і метаболічних процесах, у зв'язку з чим досліджена його концентрація ще не сприймається як діюча та не викликає від-

повідної реакції досліджуваної тканини. Щодо органів *L. stagnalis*, то зафіксовано багатовекторний вплив іонів досліджених металів на вміст в них β -каротину.

Встановлено, що іони Cr^{3+} обумовлювали збільшення обговорюваних показників на 45,73 % ($p < 0,01$) у гепатопанкреасі, на 44,74 % ($p < 0,05$) у мантиї та в 2,09 рази ($p < 0,001$) у нозі досліджуваних молюсків. Іон Cr^{3+} є сильним окиснювачем та, як відомо, попадаючи в клітини, може зв'язуватись з лігандами або ж брати участь у окисно-відновних процесах, викликаючи окислення ліпідів, білків, ДНК чи викликати виснаження глутатіону [14]. У зв'язку з цим, збільшується вміст β -каротину, який зміцнює імунітет тварини та допомагає ендогенним ферментам детоксикувати вільні радикали, що утворюються під час імунної активності, що і підтверджується нашими дослідженнями.

За умови інтоксикації усіма іншими іонами вміст β -каротину був досить органоспецифічним. Зокрема, дія іонів Zn^{2+} та Cd^{2+} викликала збільшення показників у гепатопанкреасі та нозі (на 18,5—46,58 %), однак у мантиї досліджуваних тварин іони Zn^{2+} обумовлювали зменшення вмісту каротиноїду на 34,81 % ($p \leq 0,05$), а іони Cd^{2+} на даний показник не впливали.

Дводобова дія Ni^{2+} та Mn^{2+} викликала зменшення вмісту β -каротину на 37,9—40,83% ($p \leq 0,05$) у гепатопанкреасі, його збільшення на 23,24—37,5 % у мантиї, а для ноги не встановлено статистично достовірних відмінностей. Така ж нелінійна органоспецифічна динаміка зафіксована і за дії іонів Pb^{2+} , які викликали зменшення показників (на 25,36 %) у мантиї, їх збільшення (на 13,22%) у нозі, а у гепатопанкреасі не проявляли змін щодо вмісту β -каротину. За дії іонів купруму вміст β -каротину зменшувався на 15,47 % у мантиї. Разом з тим, для гепатопанкреасу та ноги не зафіксовано статистично достовірних відмінностей, що пов'язано, імовірно, із участю даного елемента в синтезі кисеньтранспортного білка *L. stagnalis* гемоціаніну.

При збільшенні експозиції токсикологічного досліду до 7 діб за дії Ni^{2+} , Cd^{2+} та Cr^{3+} зафіксовано стимуляцію обмінних процесів в організмі *L. stagnalis*, що проявилось збільшенням вмісту β -каротину у гемолімфі тварин на 14,5—35,4 %. (рис. 2).

Така динаміка може свідчити про активацію загальної антиоксидантної активності організму молюсків, яка, імовірно, має компенсаторний характер і виникає у відповідь на токсичну дію.

Водночас, дія іонів Mn^{2+} та Zn^{2+} обумовила зниження досліджуваних показників (на 13,5—29,0 %) ($p \leq 0,05$), а перебування в середовищі з іонами п्लумбуму чи купруму не викликало статистично достовірних відмінностей у досліджуваній тканині.

У гепатопанкреасі молюсків зі збільшенням експозиції до 7 діб за дії іонів Cr^{3+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} та Ni^{2+} відмічається збільшення вмісту β -каротину в 1,2—2,2 рази. При цьому найбільш значне відхилення від контролю зафіксовано за дії іонів цинку (в 2,2 рази ($p \leq 0,01$), який, потрапляючи до ор-

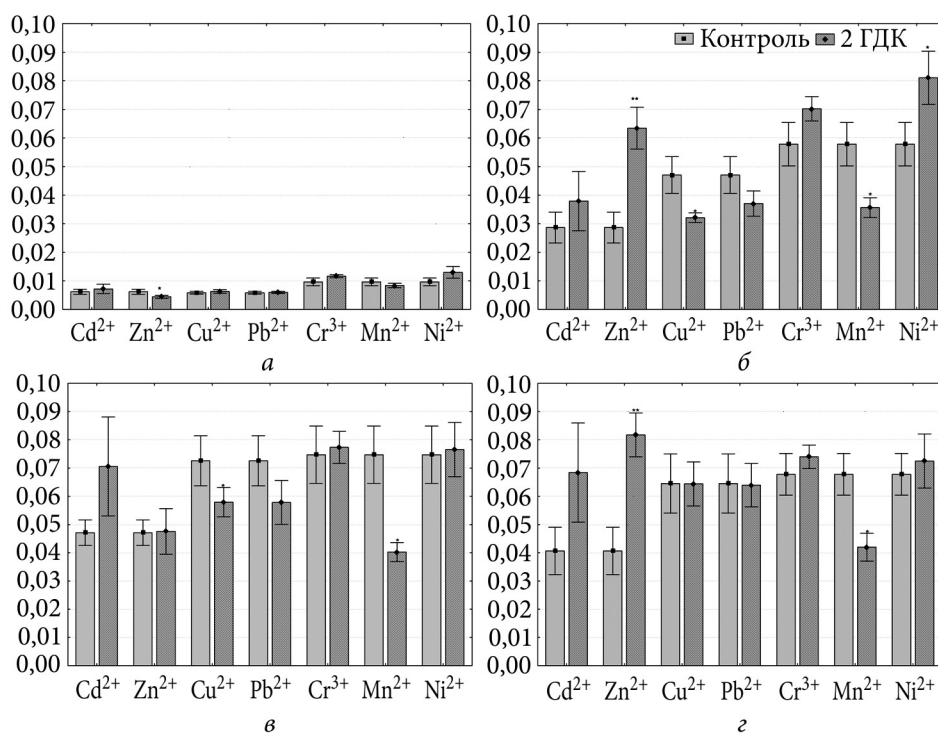


Рис. 2. Вплив іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину ($M \pm m$, $n = 10$) в організмі *L. stagnalis* (експозиція 7 діб): а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантия; з — нога

ганізму гідробіонтів у надлишку зумовлює місцеві пошкодження їх покривів тіла та порожнини легені, що призводить до ускладнення шкірного та легеневого дихання та порушення окисно-відновних процесів в клітині. У відповідь на гіпоксію відбувається вилучення кисню, депонованого за рахунок спряжених подвійних зв'язків в молекулі каротиноїду, в результаті чого обговорювані сполуки набувають природного забарвлення та фіксуються у видимій області спектра. Окрім цього, доведено прооксидантні властивості недепонованої форми цинку [11, 18], що також обумовлює потребу органу в антиоксидантному захисті від ПОЛ.

Щодо іонів купруму, мангану та плюмбуму, то збільшення тривалості експозиції до 7 діб посилило їх інгібуючий ефект на вміст β -каротину в гепатопанкреасі досліджуваних молюсків, що проявилось зниженням обговорюваних показників на 21,3—38,4 % ($p \leq 0,05$).

У мантиї *L. stagnalis* відзначено збільшення вмісту β -каротину за дії Cd^{2+} (на 49,7 %), зниження показників на 20,4—46,2 % за дії Pb^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} та відсутність статистично достовірних відмінностей вмісту β -каротину при інкубуванні молюсків у розчинах з іонами Cr^{3+} , Ni^{2+} та Zn^{2+} . Щодо ноги, то тижнева експозиція тварин у розчинах з іонами цинку та кадмію викликала збільшення вмісту β -каротину в даному органі від-

повідно в 2,01 раза ($p \leq 0,01$) та на 68,0 %. Зниження показників на 38,0 % ($p \leq 0,05$) обумовлювала дія Mn^{2+} , а за дії Cr^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} показники вмісту β -каротину у контрольній та дослідній груп знаходились в одному діапазоні значень. Збільшення часу перебування молюсків до 14 діб посилило токсичну дію переважної більшості досліджуваних іонів та викликало порушення функціонально-метаболічного гомеостазу *L. stagnalis*, що проявилось зменшенням вмісту β -каротину в усіх досліджених органах (рис. 3).

Відмічено зниження показників незалежно від дослідженого органу на 12,20—66,91 % за дії Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} та Cr^{3+} , що, імовірно, вказує на тимчасовий характер адаптації *L. stagnalis* до дії досліджуваних іонів та зміною фази стимуляції обмінних процесів фазою виснаження внаслідок порушення адаптаційних механізмів.

Виняток із загальної тенденції склала гемолімфа, у якій зафіксовано суттєве зростання показників за дії Cr^{3+} (в 3,22 раза ($p \leq 0,001$)) та нога тварин, у якій не встановлено статистично достовірних відмінностей між контрольною групою та молюсками, підданих дії іонів нікелю.

Щодо іонів плумбуму, то зафіксовано нелінійну органоспецифічну динаміку: показники зменшувались (на 26,79 та 33,17 %) у мантиї та нозі,

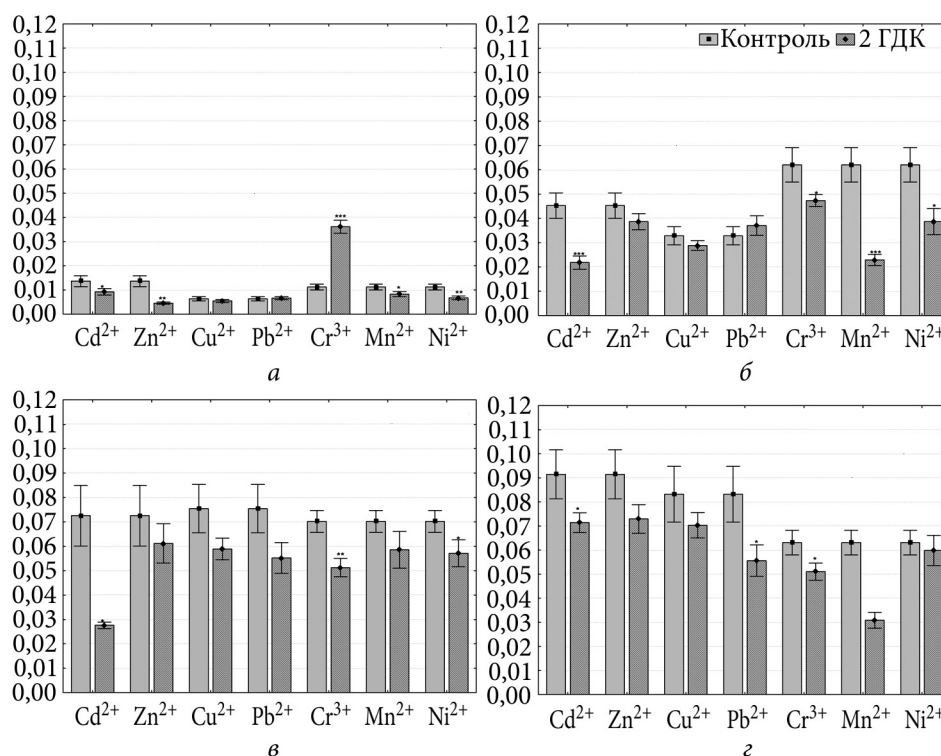


Рис. 3. Вплив іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину ($M \pm m$, $n = 10$) в організмі *L. stagnalis* (експозиція 14 діб): а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантия; г — нога

збільшувались на 12,80 % у гепатопанкреасі, а у гемолімфі знаходились на рівні контрольної групи тварин.

Збільшення часу експозиції з іонами Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} та Pb^{2+} до 21 доби викликало однотипову реакцію *L. stagnalis* у вигляді зниження кількісних показників вмісту β -каротину у їх гемолімфі (на 18,03—62,7 %), мантиї (12,5—63,2 %), гепатопанкреасі (на 19,8—65,2 %) та нозі (на 10,3—65,2 %) (рис. 4).

При цьому зазначений ефект (у порядку збільшення відсоткового відхилення від контролю) вибудовує такі ряди:

Гемолімфа: $Pb^{2+} < Mn^{2+} < Cd^{2+} < Ni^{2+} < Zn^{2+}$.

Мантия: $Zn^{2+} < Cd^{2+} < Pb^{2+} < Ni^{2+} < Mn^{2+}$.

Гепатопанкреас: $Pb^{2+} < Mn^{2+} < Ni^{2+}$.

Нога: $Cd^{2+} < Pb^{2+} < Zn^{2+} < Mn^{2+} < Ni^{2+}$.

Такий ефект зумовлений, очевидно, інгібуючою дією іонів ВМ на метаболічні процеси в організмі молюсків, порушенням механізму транспорту β -каротину в клітини внаслідок деструктивного впливу їхніх іонів на мембрани, а також активацією депресивної фази патологічного процесу, зумовленого отруєнням тварин.

Виняток із загальної тенденції склав гепатопанкреас, у якому зафіксовано незначне збільшення вмісту β -каротину (на 20,8 %) за дії іонів

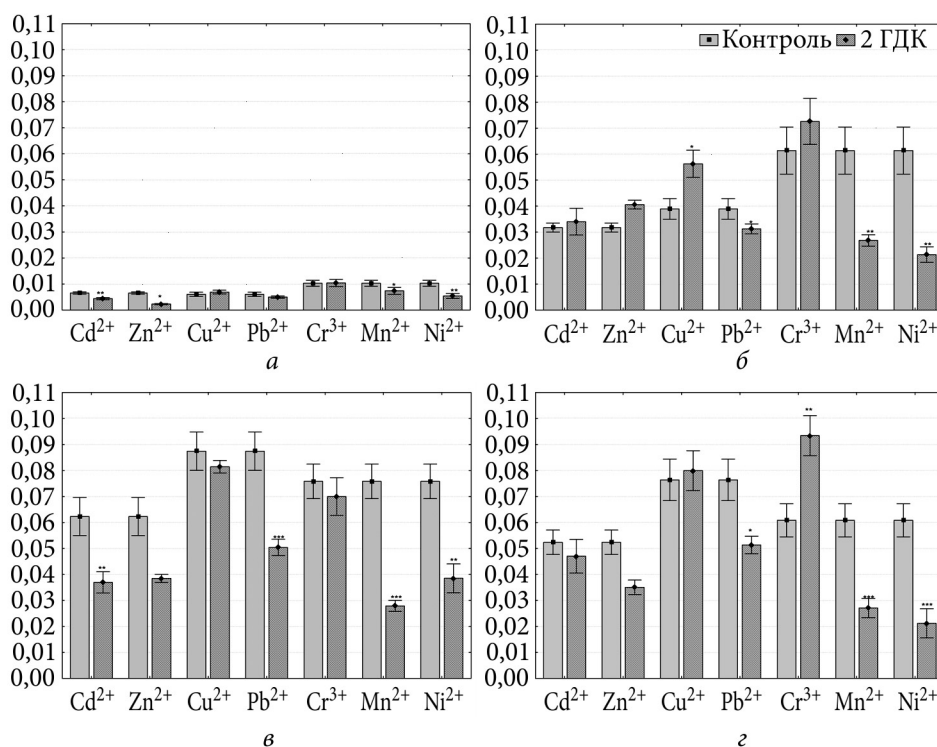


Рис. 4. Вплив іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину ($M \pm m_x$, $n = 10$) в організмі *L. stagnalis* (експозиція 21 доба): а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантия; з — нога

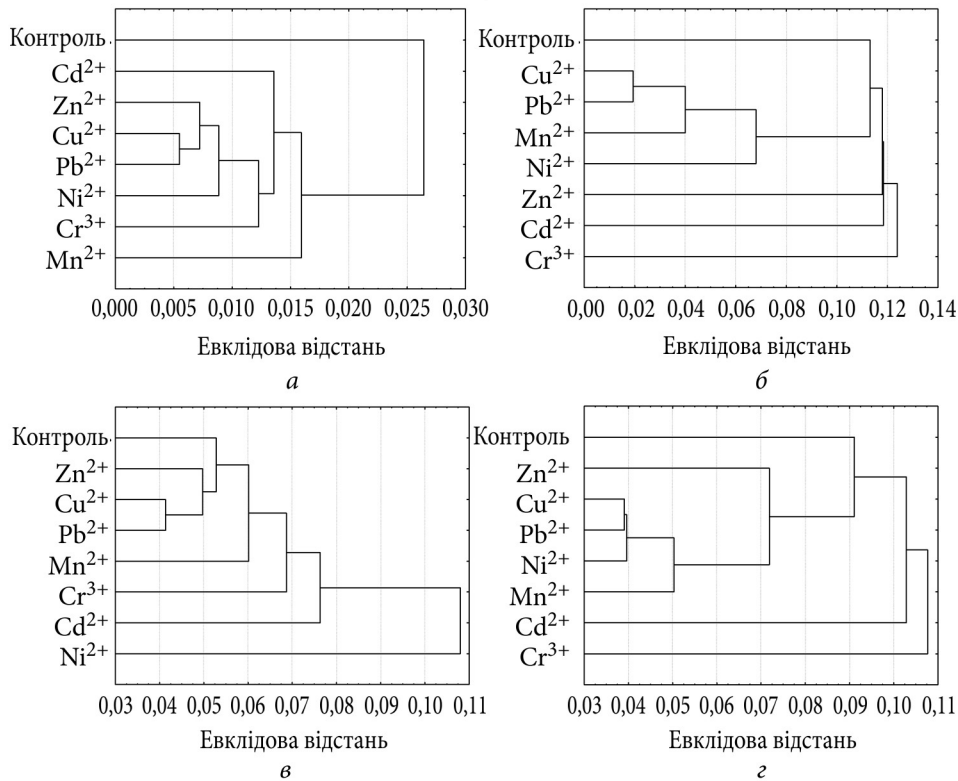


Рис. 5. Дендрограма подібності впливу іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину в організмі *L. stagnalis*: а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантия; г — нога (експозиція 2 доби)

Zn^{2+} та не встановлено статистично достовірних відмінностей від контролю при перебуванні досліджуваних молюсків у середовищі, затруєному іонами Cd^{2+} .

Поряд з цим, дія Cr^{3+} вказаної концентрації не призвела до статистично достовірних змін вмісту β -каротину в гемолімфі та мантиї та обумовила підвищення показників на 18,24—53,62 % у гепатопанкреасі та нозі досліджуваних молюсків. Ймовірно збільшення вмісту каротиноїду у гепатопанкреасі та нозі викликане зміною каротиноїдами просторової конфігурації та переходом їх із зв'язаної з ліпідами та білками форми (шляхом денатурації) у вільну.

Іони купруму викликали зростання показників вмісту β -каротину в гемолімфі та гепатопанкреасі (на 13,1—44,47 %), а у мантиї та нозі показники контрольної та дослідної груп виявились величинами одного порядку.

Проведений ієрархічний кластерний аналіз дозволив виявити деякі закономірності впливу досліджених іонів ВМ в концентрації 2 ГДК_{рибогосп.}

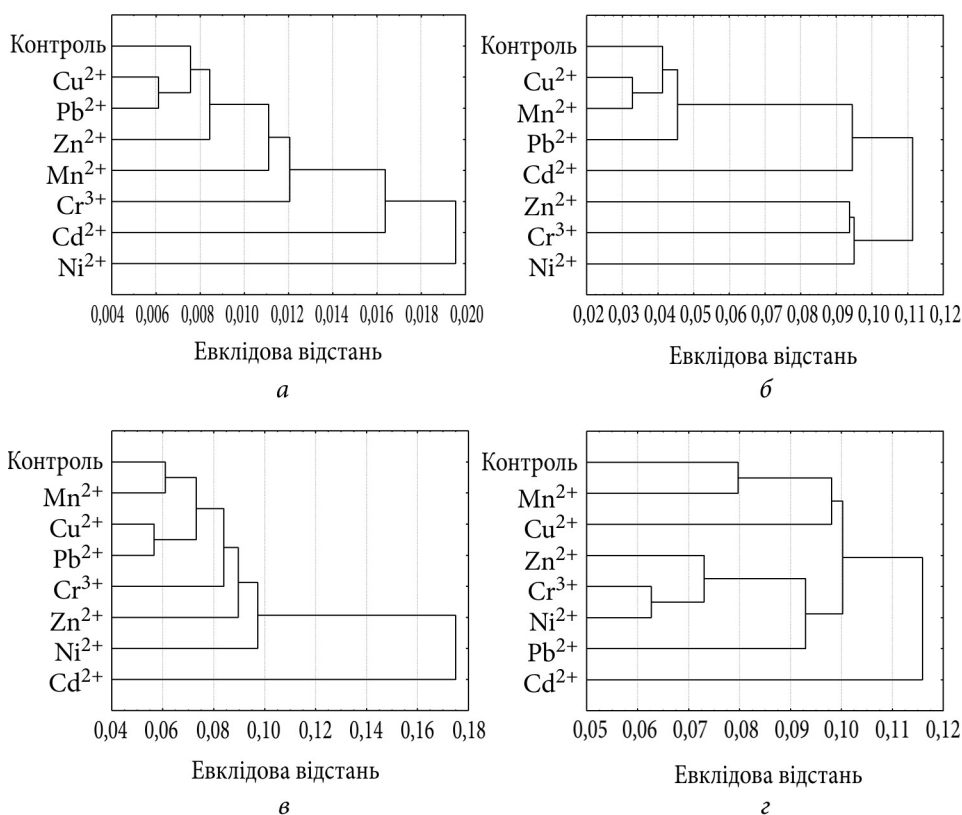


Рис. 6. Дендрограма подібності впливу іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину в організмі *L. stagnalis*: а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантия; з — нога (експозиція 7 діб)

на вміст β -каротину в організмі *L. stagnalis* (експозиція — 2, 7, 14 та 21 доба).

Аналіз структур сформованих кластерів показав, що в окремих тканинах (органах) ефект викликаний досліджуваними іонами ВМ (експозиція — 2 доби) є різний (рис. 5).

Для гемолімфи *L. stagnalis* було виокремлено 2 кластери: 1 — ефект, викликаний усіма досліджуваними нами іонами; 2 — контроль. Така динаміка свідчить про те, що дія іонів ВМ в концентрації, що відповідає 2 ГДК, навіть за короткострокової експозиції викликає відповідну реакцію тканини. Для гепатопанкреасу можна відзначити відмежування в окремий кластер токсичного ефекту, викликаного дією іонів Cr^{3+} , а у мантиї в окремий кластер відділився ефект дії іонів Ni^{2+} . Щодо ноги, то за подібністю впливу на вміст β -каротину виділено три групи досліджуваних іонів.

При збільшенні тривалості експозиції до 7 діб відмічено іншу картину кластеризації (рис. 6).

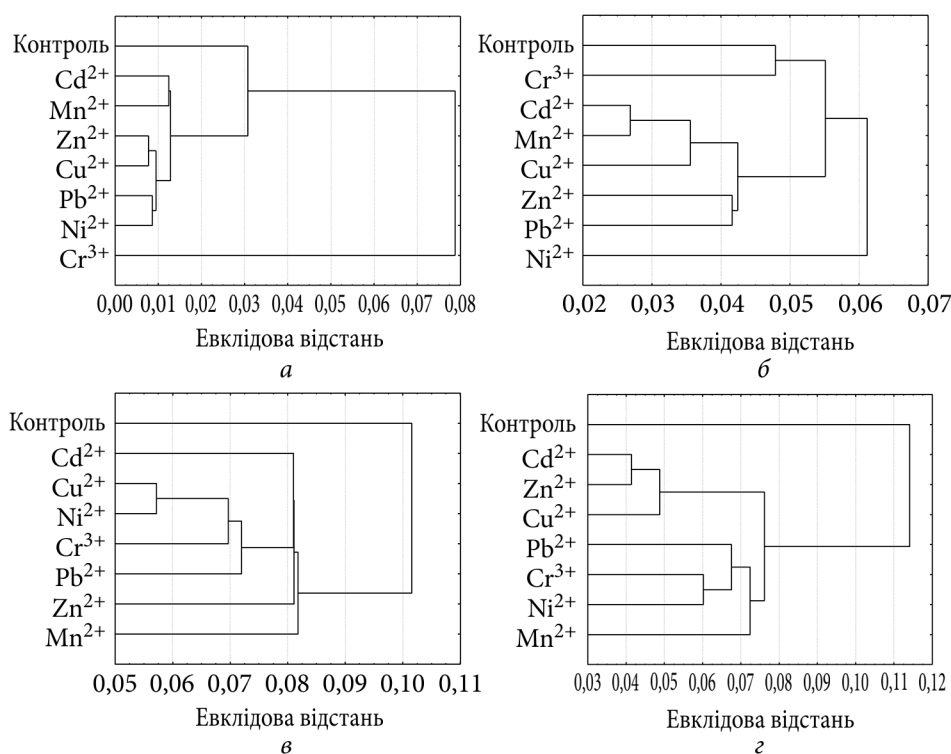


Рис. 7. Дендрограма подібності впливу іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину в організмі *L. stagnalis*: а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантія; г — нога (експозиція 14 діб)

Для гемолімфи відмічено відмежування в окремий кластер біохімічного ефекту, викликаного іонами Cu^{2+} та Pb^{2+} . Всі інші досліджені нами іони не вдалося згрупувати за викликаним ефектом, адже окремі об'єкти мають ознаки індивідуальності, у зв'язку з чим їх можна розглядати як окремі кластери.

Водночас, у гепатопанкреасі визначено три групи іонів: 1 — ефект, викликаний іонами Cu^{2+} , Mn^{2+} та Pb^{2+} ; 2 — ефект дії Ni^{2+} , Cr^{3+} та Zn^{2+} ; 3 — іони Cd^{2+} .

Що ж стосується мантії та ноги *L. stagnalis*, то відмічено виділення в окремий кластер іонів кадмію, які не виконують в організмі моллюсків фізіологічних функцій, не залучаються у регуляторні процеси та діють виключно як токсикант.

За експозиції 14 діб аналіз спорідненості впливу досліджуваних іонів на вміст β -каротину в гемолімфі *L. stagnalis* показав відмежування в окрему групу токсичного ефекту, викликаного дією іонів хрому (рис. 7).

Водночас, у гепатопанкреасі тварин виділено три групи досліджуваних іонів. Спорідненими за ступенем впливу в органі виявились іони

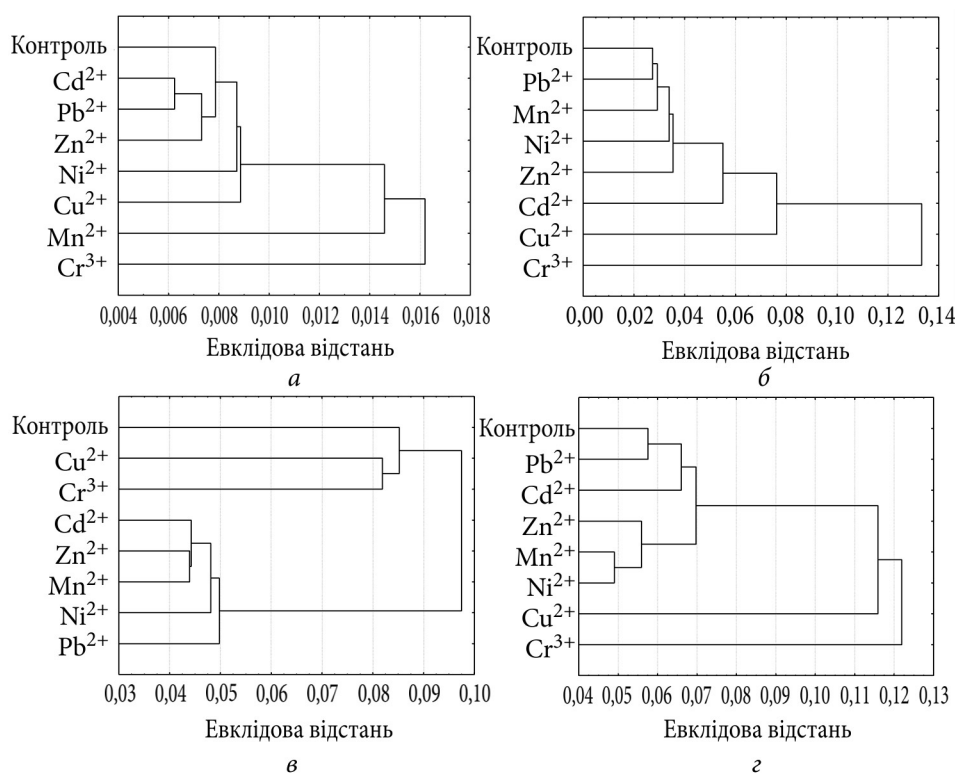


Рис. 8. Дендрограма подібності впливу іонів важких металів (2 ГДК) на вміст β -каротину в організмі *L. stagnalis*: а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантия; г — нога (експозиція 21 доба)

Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Pb^{2+} . В окремий кластер відмежовано токсичний ефект, викликаний іонами нікелю.

Для мантиї та ноги моллюсків відмічено іншу тенденцію: в окремий кластер відділяється контроль, а досліджувані іони формують другу групу.

При збільшенні тривалості експозиції до 21 діб в гемолімфі, гепатопанкреасі та нозі *L. stagnalis* відмічено відмежування в окремий кластер іонів хрому, який має подвійну дію та здатний проявляти одночасно антиоксидантні та прооксидантні властивості.

Для мантиї за результатами аналізу спорідненості впливу на вміст β -каротину виокремлено два кластери (рис. 8).

За токсичними ефектами визначено спорідненість іонів Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} , а за регуляторними — іонів купруму та хрому.

Висновки

Отже, зміни вмісту β -каротину в тканинах та органах *L. stagnalis* є одним з елементів їх компенсаторно-адаптивної відповіді та проявляються

в певних межах токсичного навантаження і направлені на підтримку гомеостазу цих тварин за дії іонів ВМ. Зміна кількісного вмісту β -каротину в організмі *L. stagnalis* може свідчити про розвиток компенсаторного механізму у відповідь на дію токсикантів з одного боку, а з іншого про можливі патологічні зміни в їх організмі.

Виявлено, що 2-добова експозиція у токсичних розчинах Cr^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} та Cd^{2+} призвела до збільшення вмісту β -каротину у гемолімфі *L. stagnalis*, що вказує на розвиток миттєвої відповіді тварин на токсичну дію. Максимальне відхилення від контролю зафіксовано за дії Cr^{3+} та Mn^{2+} (на 81,48 %) ($p \leq 0,01$), а мінімальне — за дії іонів купруму (на 11,1 %).

У досліджуваних органах дводобова експозиція обумовлювала різноплановий вплив іонів ВМ на вміст в них β -каротину. Іони Cr^{3+} обумовлювали збільшення показників в 1,43—2,09 раза ($p \leq 0,05$ —0,001), а дія на молюсків розчинів усіх інших досліджених нами іонів ВМ характеризувалась досить органоспецифічною динамікою вмісту β -каротину.

Збільшення тривалості експозиції до 14 діб посилює токсичну дію Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} та Zn^{2+} на організм молюсків, що призвело до зниження досліджуваного показника (на 12,20—66,91 %) незалежно від дослідженого органу (виняток — гемолімфа, у якій зафіксовано зростання показників за дії Cr^{3+} та нога тварин, у якій не встановлено статистично достовірних відмінностей між контрольною групою та молюсками, підданих дії іонів нікелю).

Збільшення тривалості дії іонів Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} та Pb^{2+} до 21 доби викликало однотипову реакцію у *L. stagnalis* у вигляді зниження кількісних показників вмісту β -каротину у гемолімфі (на 18,03 — 67,70%), мантиї (12,5—63,2 %) та нозі (на 10,3—65,2 %).

Мінімальними показниками вмісту β -каротину незалежно від токсиканту і тривалості його дії на організм характеризується гемолімфа тварин. Максимальні значення варіювали між органами (тканинами) залежно від досліджуваного іону та тривалості експозиції тварин у токсичних розчинах.

Список використаної літератури

1. Грубінко В.В. Адаптивні стратегії токсикорезистентності до металів у гідробіонтів. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2017. № 2 (69). С. 129—149.
2. Клименко М.О., Вознюк Н.М., Вербецька К.Ю. Порівняльний аналіз нормативів якості поверхневих вод. *Наук. доп. НУБіП.* 2012. № 1 (30). URL: http://nd.nubip.edu.ua/2012_1/12kmo.pdf.
3. Музика Л.В., Киричук Г.Є. Особливості дії низьких концентрацій іонів кадмію на вміст β -каротину в організмі *Lymnaea stagnalis*. *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біологічна.* 2015. № 70. С. 130—137.
4. Набиванець Б.Й., Сухан В.В., Калабіна Л.В. Аналітична хімія природного середовища. Київ : Либідь, 1996. 304 с.
5. Фетісов В.С. Пакет статистичного аналізу даних STATISTICA : навч. посіб. Ніжин : НДУ ім. М. Гоголя, 2018. 114 с.
6. Barim O., Karatepe M. The effects of pollution on the vitamins A, E, C, β -carotene contents and oxidative stress of the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 2010. Vol. 73, N 2. P. 138—142. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.08.002

7. Benzer S., Arslan H., Uzel N. et al. Concentrations of metals in water, sediment and tissues of *Cyprinus carpio* L., 1758 from Mogan Lake (Turkey). *Iranian J. Fisher. Sci.* 2013. Vol. 12, N 1. P. 45—55. doi: 20.1001.1.15622916.2013.12.1.5.8
8. Chaâbane M., Bejaoui S., Trabelsi W. et al. The potential toxic effects of hexavalent chromium on oxidative stress biomarkers and fatty acids profile in soft tissues of *Venus verrucosa*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 2020. Vol. 196. 110562. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110562
9. Gao Y., Focsan A.L., Kispert L.D. Antioxidant activity in supramolecular carotenoid complexes favored by nonpolar environment and disfavored by hydrogen bonding. *Antioxidants.* 2020. Vol. 9, N 7. P. 1—21. doi: 10.3390/antiox9070625
10. Galasso C., Corinaldesi C., Sansone C. Carotenoids from marine organisms : Biological functions and industrial applications. *Antioxidants.* 2017. Vol. 6, N 4. 96. doi: 10.3390/antiox6040096
11. Gnatyshyna L.L., Fal'fushinskaya G.I., Golubev O.P. et al. Role of metallothioneins in adaptation of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Pulmonata) to environment pollution. *Hydrobiol. J.* 2011. Vol. 47, N 5. P. 56—66. doi: 10.1615/HydrobJ.v47.i5.50
12. Jijie R., Solcan G., Nicoara M. et al. Antagonistic effects in zebrafish (*Danio rerio*) behavior and oxidative stress induced by toxic metals and deltamethrin acute exposure. *Sci. Total Environ.* 2020. Vol. 698. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134299
13. Kyrychuk G.Y., Muzyka L.V. Peculiarities of the distribution of β -carotene in the organism of *Lymnaea stagnalis* under the influence of the ions of heavy metals. *Hydrobiol. J.* 2016. Vol. 52, N 5. P. 63—72. doi: 10.1615/HydrobJ.v52.i5.70
14. Livingstone D.R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire.* 2003. Vol. 154, N 6. P. 427—430.
15. Luoma S.N., Rainbow P.S. Sources and cycles of trace metals. Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge : Cambridge University Press, 2008. 66 p.
16. Mahboob S. Environmental pollution of heavy metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Life Sci. J.* 2013. Vol. 10. P. 336—347.
17. Nishida Y. The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly.* 2011. Vol. 142. P. 375—384. doi:10.1007/s00706-010-0444-8
18. Parat M.O., Richard M.J., Béani J.C., Favier A. Involvement of zinc in intracellular oxidant/antioxidant balance. *Biological trace element research.* 1997. Vol. 60. P. 187—204. doi:10.1007/bf02784439
19. Pinto E., Sigaud-kutner T.C., Leitao M.A. et al. Heavy metal induced oxidative stress in algae 1. *J. Phycol.* 2003. Vol. 39, N 6. P. 1008—1018. doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
20. Sevcikova M., Modra H., Slaninova A., Svobodova Z. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinarni Medicina.* 2011. Vol. 56, N 11. P. 537—546. doi: 10.17221/4272-vetmed
21. Tan K., Zhang H., Lim L.S. et al. Roles of carotenoids in invertebrate immunology. *Frontiers in Immunology.* 2020. Vol 10. P. 3041. doi:10.3389/fimmu.2019.03041
22. Taylor S.L., Lamden M.P., Tappel A.L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids.* 1976. Vol. 11, N 7. P. 530—538. doi: 10.1007/bf02532898. pmid: 948248.
23. Turan F., Eken M., Ozyilmaz G. et al. Heavy metal bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in African catfish *Clarias gariepinus* from Orontes river. *Ecotoxicology.* 2020. Vol. 29, N 9. P. 1522—1537. doi: 10.1007/s10646-020-02253-w
24. Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 2006. Vol. 64, N 2. P. 178—189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013
25. Vareda J.P., Valente A.J., Durres L. Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review. *J. Environ. Management.* 2019. Vol. 246. P. 101—118. doi:10.1016/j.jenvman.2019.05.126

G.Ye. Kyrychuk, Dr. Sci. (Biol.), Prof.
Zhytomyr Ivan Franko State University,
Velyka Berdychivska Str., 40, Zhytomyr, 10008, Ukraine
e-mail: kyrychuk@zu.edu.ua
ORCID: 0000-0002-1059-2834

L.V. Muzyka, PhD (Biol.), Assoc. Prof.,
Zhytomyr Ivan Franko State University,
Velyka Berdychivska str., 40, Zhytomyr, 10008, Ukraine
e-mail: lidiya.muzyka@ukr.net
ORCID: 0000-0001-7752-7853

M. M. Mykula, PhD
Bogomolets National Medical University,
Taras Shevchenko Blvd, 13, Kyiv, 01601, Ukraine
e-mail: mykula.nmu@gmail.com
ORCID: 0000-0002-9752-8711

PECULIARITIES OF LOW CONCENTRATIONS OF HEAVY METAL IONS EFFECTS ON THE β -CAROTENE CONTENT IN THE BODY OF *LYMNAEA STAGNALIS*

The article investigates the influence of heavy metal ions cadmium (Cd^{2+} , 0.01 mg/L), zinc (Zn^{2+} , 0.02 mg/L), copper (Cu^{2+} , 0.002 mg/L), plumbum (Pb^{2+} , 0.02 mg/L), chrome (Cr^{3+} , 0.01 mg/L), manganese (Mn^{2+} , 0.02 mg/L), nickel (Ni^{2+} , 0.02 mg/L) on the β -carotene content in the hemolymph, hepatopancreas, mantle and foot of *Lymnaea stagnalis*. It determines the content of the analyzed carotenoid in mollusks' tissues (organs) subjected to different exposures (2-, 7-, 14- and 21-day) in a toxic environment. It proves that the changes in indicators are described by non-linear dynamics, which is related to the nature and specificity of the ions' effects, the exposure time of the animals in toxic solutions, and the metabolic features of organs and tissues of the mollusks.

The research has proven that the two-day exposure of Cr^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} ions leads to an increase in the β -carotene content in the *L. stagnalis* hemolymph, which indicates the development of an immediate response of the animals to the toxic effects aimed at maintaining homeostasis. In the hepatopancreas, mantle, and foot of *L. stagnalis*, chromium ions (regardless of the degree of oxidation) (two-day exposure) caused a 1.43–2.05-fold increase in indicators ($p \leq 0.05$ – 0.001), and the dynamics of β -carotene content during mollusks' incubation in the solutions of all studied ions is organ-specific.

The study ascertains that the prolonged fourteen-day exposure to Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} and Zn^{2+} increases their inhibitory effect on the *L. stagnalis* metabolism, which is manifested by a decrease in the β -carotene content throughout their body by 12.20–66.91% (the exception is the hemolymph of the animals, in which a significant increase in indicators due to the effects of Cr(III) has been established (by 3.22 times ($p \leq 0.001$)) and the foot, in which the control level for the effects of nickel ions has been indicated). The article carries out a hierarchical cluster analysis, which provides a possibility to reveal the patterns of HM ions influence (exposures 2-, 7-, 14- and 21-day) on β -carotene content in the hemolymph, hepatopancreas, mantle and foot of *L. stagnalis*.

Key words: β -carotene, heavy metals, antioxidant activity, oxidative stress, metabolic adaptation, freshwater mollusks.