

УДК 576. 895. 122: 594. 38

ВПЛИВ ТРЕМАТОДНОЇ ІНВАЗІЇ НА АКТИВНІСТЬ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ У РІЗНИХ ОРГАНАХ І ТКАНИНАХ ВИТУШКИ (MOLLUSCA: GASTROPODA: PULMONATA: BULINIDAE) ЗА ДІЇ НА НЕЇ ЙОНІВ КАДМІЮ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

Киричук Г.Є., Стадниченко А.П.

The trematode invasion influence on the activity of alkaline phosphatase in the various organs and tissues of the horn coil (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Bulinidae) under Cd²⁺ affect of the water environment.-Kyrychuk G.Ye., Stadnychenko A.P.-The influence of trematode invasion on the activity of alkaline phosphatase in the mantle, hepatopancreas and haemolymph of the gastropod mollusk, Planorbarius purpura under affect of Cd²⁺ of the water environment have been investigated. It has been revealed that the most influence among them is hepatopancreas, the least influenced one – haemolymph. Infected mollusks have the same indicators as non-infected ones according to the least concentrated toxic elements influence. When concentrated elements containing Cd²⁺ are equal death-rate on the invaded organisms is higher that of non-invaded P. purpura.

Житомирський державний університет, кафедра зоології, вул. В. Бердичівська 40, м. Житомир, 10008 Україна, e-mail: Kyrychuk@zu.edu.ua

Вступ

Лужна фосфатаза – це фермент, який, каталізуючи гідроліз складних ефірів фосфорної кислоти, сприяє утворенню неорганічного фосфату, необхідного для здійснення низки процесів обміну речовин. Її біологічна роль пов'язана з участю в обміні вуглеводів, фосфоліпідів, РНК і ДНК. За рівнем змін активності цього ферменту у різних органах і тканинах можна судити про характер зрушень у них інтенсивності процесів метаболізму, зумовлених дією на організми тих чи інших чинників як внутрішнього середовища моллюсків, так і навколишнього середовища. Метою даного дослідження було з'ясування напрямлення і інтенсивності змін активності лужної фосфатази у мантиї, гепатопанкреасі і гемолімфі витушки за дії на неї гельмінтів і йонів важких металів. Такі дослідження необхідні для з'ясування того, чи потрібно зважати на ці чинники, використовуючи витушку як вид-монітор, а активність лужної фосфатази – як тест-функцію у системі біологічного моніторингу. Вибір вищезгаданих чинників не є випадковим. Адже за результатами 40-річних досліджень А.П. Стадниченко середня екстенсивність інвазії витушок по Україні становить $13,5 \pm 0,4\%$, а в окремих біотопах вона сягає 98 і навіть 100%. А йони важких металів у цей час – один із найпоширеніших видів забруднення природних вод [10]. Такі дослідження раніше не проводилися.

Матеріал та методика досліджень

87 екз. витушки пурпурної *Planorbarius purpura* (O. F. Müller, 1774), зібраних у червні – серпні 2004 р. у басейні р. Тетерів (м. Житомир). Для аналізу використано мантию і гепатопанкреас, які добували, анатомуючи тварин, а також гемолімфу, отримувану повним знекровлюванням моллюсків. Розчин білків виділяли гомогенізуванням тканин в 0,01 М тріс-НСІ (рН 7,6). Цитоплазматичну фракцію здобували центрифугуванням гомогенату (20 хв, 8000 об.). Активність лужної фосфатази встановлювали застосуванням фотоелектрокалориметру КФК – 2 МП за допомогою реакції утворення хіноніміну [4]. Кількість білка при оцінці активності фермента визначали за Лоурі. Активність фосфатази розраховували у нмоль/с · 1 мг білка. Всього виконано 482 біохімічних аналізів. Цифрові результати їх оброблено методами варіаційної статистики [6].

У токсикологічних дослідах для затравлювання середовища використано хлорид кадмію – $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ (ч. д. а.) у найбільш токсичній для гідробіонтів [9] іонній формі. Розрахунок концентрацій усіх розчинів здійснено за катіоном. Токсикологічні аналізи поставлено за методикою Алексєєва [1]. Орієнтаційним дослідом (експозиція 2 доби) встановлено значення основних токсикологічних показників

(мг/дм³): МВК (LC₀) = 0,1, ЛК₅₀ (LC₅₀) = 5, ЛК₁₀₀ (LC₁₀₀) = 100.

У гострому хронічному досліді (експозиція 2 доби) використано концентрації такого ступеня летальності їх для *P. purpurus* (мг/дм³): ЛК₂₅ = 1, ЛК₅₀ = 5, ЛК₇₅ = 25.

Розчини токсикантів готували на дехлорованій відстоюванням (доба) воді з житомирської водогінної мережі (рН 7,2 – 7,5; температура 18 – 20°C; вміст кисню – 8,5 – 8,9 мг/л; освітлення природне). Токсичне середовище заміняли свіжим через 24 год. Контролем слугували витушки, котрі перебували у водопровідній дехлорованій воді. Фазність отруєння прийнято за Веселовим [3].

Масу тіла молюсків встановлювали на електронних вагах (WPS 1200/С). Зараженість тварин паргенітами (спороцисти, редії) і розповсюджувальними личинками (церкарії) виявляли мікроскопуванням (× 56) тимчасових гістологічних препаратів, виготовлених із

тканини їх гепатопанкреаса. Для дослідження відібрано молюсків, інвазованих трематодами родини *Echinostomatidae*, марити яких є кишковими паразитами водоплавних птахів.

Результати досліджень та їх обговорення

У тварин контрольної групи у досліджених органах і тканинах зареєстровано неоднаковий рівень активності лужної фосфатази. Найвищим він є у гепатопанкреасі (13528,94 ± 2807,56), найнижчим – у гемолімфі (826,82 ± 152,03). У мантиї активність ферменту перевищує таку у гемолімфі у 3,2 рази (P = 99,5%) і менша від такої у гепатопанкреасі у 5,1 рази (P > 99,9%) (рис. 1). У молюсків, інвазованих трематодами, активність лужної фосфатази утворює такий же ряд (у порядку зменшення показника): гемолімфа ← мантия ← гепатопанкреас (рис. 2).

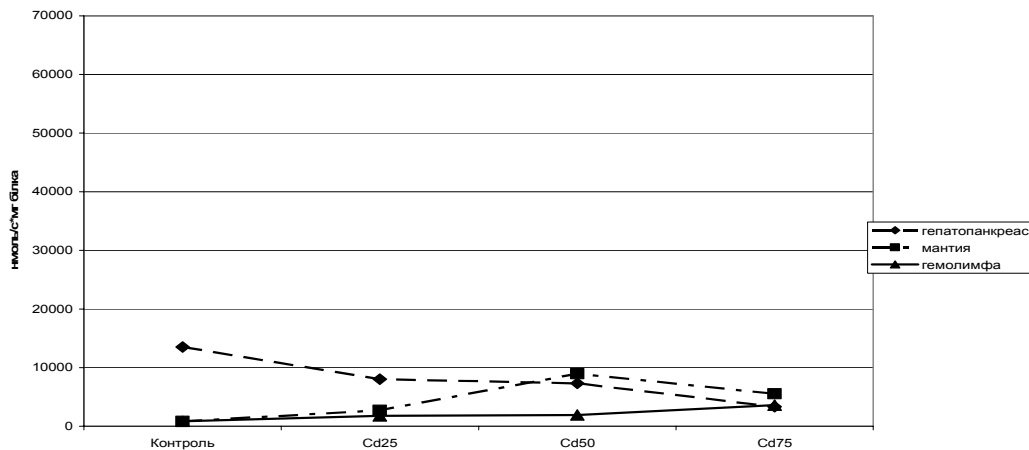


Рис. 1. Активність лужної фосфатази в організмі неінвазованих *P. purpurus*

Слід зауважити, що в гепатопанкреасі і у гемолімфі вона майже однакова у всіх обстежених тварин. Водночас виявлено статистично вірогідну різницю (P > 99,9%) між незараженими і інвазованими трематодами особинами за значеннями обговорюваного показника, встановленими для мантиї. Активність у ній лужної фосфатази у заражених тварин перевищує її у вільних від інвазії молюсків у 4 рази (P = 99,7%). Зростання біохімічної активності – це один із проявів неспецифічної захисно-приспосувальної реакції молюсків до дії на них несприятливих чинників, в основі якої лежить підвищення інтенсивності обміну речовин [2,7]. Свідченням цього є й інші біохімічні зрушення, які відбуваються в організмі заражених трематодами молюсків. У них, зокрема, зростають поглинання кисню [11], тепловіддача [12], ритм серцевих скорочень [13]. За дії на *P. purpurus* паразитарного чинника відносіть цього захисного пристосування полягає в тому, що воно

проявляється тільки у випадку помірної інтенсивності інвазії¹, тобто тоді, коли організм молюска-хазяїна ще у змозі у значній мірі протистояти згубній дії паразитів, що дозволяє йому протягом тривалого часу зберігати життєздатність. За тотального ж ураження трематодами гепатопанкреаса (найзвичайніше місце оселення паразитів) захисно-приспосувальні можливості їх виявляються недостатніми для подолання патогенного впливу на них паразитів. Відбувається значне пригнічення біохімічних функцій, одним із проявів чого і є різке падіння рівня активності лужної фосфатази в різних органах і тканинах молюсків.

¹ Ураження паразитами від 1/10 до 1/2 об'єму гепатопанкреаса.

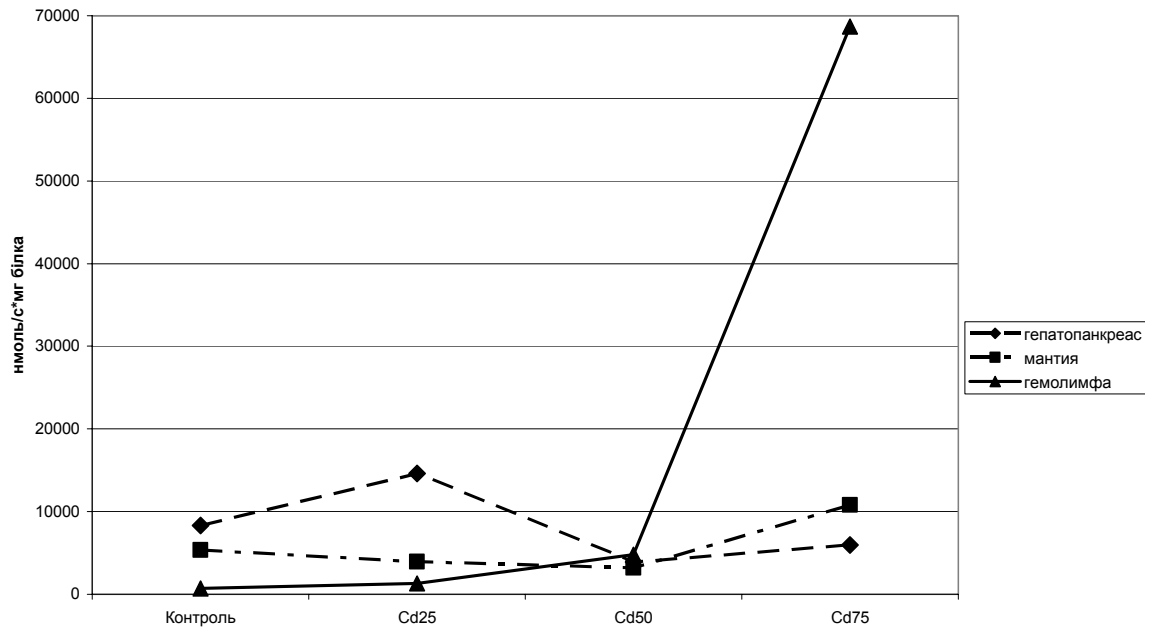


Рис. 2. Активність лужної фосфатази у інвазованих особин *P. purpura*

У середовищі, затравленому йонами кадмію у концентрації, котра відповідає LC25, у незаражених паразитами тварин активність лужної фосфатази у мантії не підпадає статистично вірогідним змінам, у той час як у інвазованих тварин вона знижується у 2,9 рази ($P > 99,9\%$). Останнє слід розглядати як один із симптомів токсикопаразитозу – мішаного захворювання [10], в якому токсикант і паразит, діючи одночасно на хазяїна, ослаблюють його захисно-приспосувальні механізми. Не дивно, що за цієї концентрації йонів кадмію у воді смертність інвазованих тварин майже втричі перевищує таку особин незаражених, становлячи близько 69,8%.

У меншій мірі патогенез отруєння торкається активності фосфатази у гемолімфі *P. purpura*. У незаражених тварин спостерігається зростання її активності в гемолімфі – важливому компоненті їх внутрішнього середовища – в 2,4 рази ($P = 97\%$). У інвазованих особин подібного взагалі не відбувається. А це означає, що за відсутності інвазії у гемолімфі молюсків обмінні процеси стимулюються, тоді як у заражених тварин це не має місця, що свідчить про пригнічення процесів їх життєдіяльності.

За більшої концентрації йонів кадмію (LC50) у воді активність лужної фосфатази у мантії незаражених тварин збільшується (у 3,5 рази; $P = 99,7\%$) порівняно з попередньою концентрацією токсиканту. Отже за цих обставин у їх мантії спрацьовують захисно-приспосувальні механізми

біохімічної природи. У гепатопанкреасі цей показник не змінюється, як і у мантії інвазованих трематодами тварин. У них, натомість, спостерігається різке падіння активності фермента (у 4,4 рази; $P = 99,5\%$) у гепатопанкреасі і зростання її у гемолімфі (у 6,8 рази; $P > 99,9\%$). Смертність заражених особин за цієї концентрації токсиканта сягає 86%.

За найвищої з використаних у досліді концентрацій йонів кадмію (LC75) у вільних від інвазії тварин активність лужної фосфатази не змінюється ні у мантії, ні у гемолімфі, але значно зменшується (в 4,7 рази; $P > 99,9\%$) у гепатопанкреасі. У заражених особин відмічено різкий стрибок активності фермента у мантії до рівня трохи вищого за норму і відсутність статистично вірогідних змін цього показника у мантії і гемолімфі. Смертність заражених особин цієї групи сягає 97%.

З наведених вище матеріалів видно, що йони кадмію є сильно токсичними для *P. purpura*². Про це свідчать як невисоке отримане для них у наших дослідях значення LC50, так і показники діючих зараз ГДК (санітарно-токсикологічна – 0,001, рибогосподарсько-токсикологічна – 0,0005 мг/дм³). Проте у вкрай невеликих дозах цей елемент відіграє важливу роль у процесах життєдіяльності тварин [5], яку саме конкретно – це належить ще з'ясувати.

² Градацію токсичності прийнято за Метелевим, Канаєвим, Дзасоховою [8].

Висновки

У всіх досліджених тварин найменш уразливим щодо активності лужної фосфатази за дії на них йонів кадмію водного середовища у концентраціях, які відповідають значенням LC25, LC50, LC75, є гемолімфа, а найбільш уразливим – гепатопанкреас. Проте у заражених трематодами моллюсків однозначні з неінвазованими *P. purpura* показники активності цього ферменту реєструються зазвичай за дії менших

концентрацій токсиканту і є більш масштабними. Отруєння моллюсків йонами кадмію відзначається фазним характером. У ході його спостерігаються одна за одною такі фази: байдужість, підвищення активності, депресія, сублетальна, летальна. Дві перші з них набагато триваліші за останні. За однакових концентрацій йонів кадмію у воді смертність інвазованих трематодами тварин значно вища у порівнянні з вільними від інвазії особинами.

1. Алексеев В.А. Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журн. – 1981. – Т. 17, №3. – С. 92 – 100.
2. Биргер Т.И. Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде.– Киев: Наук. думка, 1979. – 190 с.
3. Веселов Е.А. Основные фазы действия токсических веществ на организмы // Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. по вопр. водн. токсикологии. – М.: Наука, 1968.– С. 15 – 16.
4. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии. – Одесса: ОКФА, 1994. – 364 с.
5. Гусева Т.В., Молчанова Я.П., Заша Э.А., Виниченко В.Н., Аверочкин Е.М. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды. – М.: Эколайн, 2000. – 127 с.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1973. – 343 с.
7. Маляревская А.Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам // Гидробиол. журн. – 1985. – 21, № 3. – С. 70 – 82.
8. Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. – М.: Колос, 1971. – 247 с.
9. Мур Д., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. – М.: Мир, 1987. – 288 с.
10. Романенко В.Д. Основи гідроекології. – Київ: Обереги, 2001. – 728 с.
11. Hurst C.T. Structural and functional changes produced in the gastropod mollusk, *Physa occidentalis* in the case of parasitism by larvae of *Echinostomata revolutum* // Univ. Calif. Publ. Zool. – 1927. – 29, № 14. – P. 321 – 404.
12. Hurst C.T., Walker C.A. Increased heat production in a poikilotherm animal in parasitism // Amer. Nat. – 1933. – 69. – P. 461 – 466.
13. Lee F.O., Cheng C.T. Increased heart rate in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni* // J. Invertebr. Pathol. – 1970. – 16, №1. – P. 148 – 149.

Отримано: 3 вересня 2008 р.

Прийнято до друку: 17 квітня 2009 р.