

**Активність лужної фосфатази у різних органах і тканинах
витушки (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Bulinidae) за дії на неї
трематод і йонів свинцю**

Досліджено вплив трематодної інвазії і йонів свинцю водного середовища (0,5, 1, 5 мг/дм³) на активність лужної фосфатази у мантиї, гепатопанкреасі і гемолімфі Planorbarius purpura вільних від інвазії і заражених трематодами родини Echinostomatidae.

Постановка проблеми

Лужна фосфатаза – фермент із класу гідролаз, який каталізує гідроліз складних ефірів фосфорної кислоти з утворенням неорганічного фосфату, необхідного для забезпечення різних процесів обміну речовин. Вона, зокрема, бере участь у метаболізмі вуглеводів, фосфоліпідів, ДНК, РНК. Отже рівень активності цього ферменту в різних органах і тканинах може слугувати показником ступеня інтенсивності протікання у них обмінних процесів. Останній залежить від дії на тварин сукупності чинників як навколишнього середовища, так і внутрішнього середовища їх організму. Для прісноводних червононогих молюсків суттєвими чинниками є паразитарна інвазія і забруднення водного середовища йонами важких металів. Завданням даного дослідження було з'ясування особливостей впливу йонів свинцю і паразитів молюсків (трематод) на активність лужної фосфатази в різних її органах і тканинах. Воно зумовлене, по-перше, тим, що у багатьох гідроценозах екстенсивність і інтенсивність інвазії їх часом дуже високі. По-друге, зростає вплив йонів важких металів на гідробіонтів, оскільки ці поллютанти на початок третього тисячоліття за поширеністю і значимістю для водних організмів вийшли на одне з перших місць. Вплив цих двох чинників на активність лужної фосфатази у прісноводних молюсків раніше не досліджувався. А такі відомості необхідні для якісного проведення біологічного моніторингу з метою оцінки рівня забруднення природних вод сполуками антропогенного походження.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом дослідження слугували 87 екз. витушки *Planorbarius purpura* (O. F. Müller, 1774), зібраних у червні – серпні 2003 і 2004 р. у водоймах басейну р. Тетерів (м. Житомир). Для аналізу використовували мантию, гепатопанкреас, гемолімфу. Розчин білків виділяли гомогенізуванням матеріалу в 0,01 М тріс-НСІ (рН 7,6). Використовували цитоплазматичну фракцію отриману центрифугуванням гомогенату (20 хв, 8000 об.). Активність лужної фосфатази встановлювали на фотоелектрокалориметрі КФК – 2 МП за допомогою реакції утворення хіноніміну [3]. Кількість білка при оцінці активності фермента визначали за Лоурі. Активність ферменту розраховували у нмоль/с · 1 мг білка. Усього виконано 482 біохімічних аналізів (кожний у триразовій повторюваності). Цифрові матеріали оброблено методами варіаційної статистики [5].

Як токсикант використано водний розчин хлориду свинцю PbCl₂ (з маркіровкою ч. д. а.), у якому свинець знаходиться у найбільш небезпечній [8] для гідробіонтів йонній формі. Токсикологічні досліді поставлено за Алексєєвим [1]. Орієнтаційним дослідом (експозиція 2 доби) встановлено значення основних токсикологічних показників: МВК (LC₀) = 0,1, ЛК₅₀ (LC₅₀) = 1, ЛК₁₀₀

(LC_{100}) = 10 мг/дм³. Опісля було підібрано три концентрації для основного токсикологічного досліджу (експозиція 2 доби): 0,5 (ЛК₂₅), 1 (ЛК₅₀), 5 (ЛК₇₅) мг/дм³. Розчини готували на дехлорованій відстоюванням (доба) водопровідній воді (рН 7,2 – 7,5; температура – 18 – 20 °С; вміст кисню – 8,5 – 8,9 мг/л). Токсичне середовище оновлювали через добу. Досліди супроводжувалися контролем. Ним слугували моллюски, котрі перебували у дехлорованій водопровідній воді.

Масу моллюсків встановлювали на електронних вагах (WPS 1200/C). Зараженість тварин трематодами виявляли мікроскопуванням (7 × 8) тимчасових гістологічних препаратів, виготовлених із тканин гепатопанкреаса. Для дослідження було відібрано витушок, заражених партенітами і церкаріями трематод родини Echinostomatidae.

Результати досліджень

У незаражених трематодами моллюсків контрольної групи активність лужної фосфатази в різних їх органах і тканинах неоднакова. Найвищий її рівень зареєстровано у гепатопанкреасі – $13628,9 \pm 2907,6$, а найнижчий – у гемолімфі ($826, 8 \pm 152,0$). Активність фермента у мантиї вище такої у гемолімфі у 3,2 рази ($P = 99,5\%$) і нижча такої у гепатопанкреасі у 5,1 рази ($P > 99,9\%$) (рис. 1). У інвазованих тварин активність лужної фосфатази утворює такий же ряд (у порядку збільшення показника): гепатопанкреас → мантия → гемолімфа (рис. 2). Слід зауважити, що у гепатопанкреасі і гемолімфі вона близька за значеннями у всіх обстежених тварин. Натомість активність лужної фосфатази у мантиї вільних від інвазії і заражених витушок суттєво різняться між собою: у перших з них вона у 4 рази вища, ніж у других ($P = 99,7\%$). Зростання активності цього фермента, котре має місце за трематодної інвазії витушок, – це один із проявів неспецифічної захисно-приспосувальної реакції моллюсків до дії на них паразитарного чинника. Вона проявляється підвищенням інтенсивності загального обміну речовин [2, 6] і тих фізіологічних функцій, які на ньому базуються. Так, у заражених трематодами моллюсків зростають поглинання кисню [11], тепловіддача [12], частота серцебиття [13]. Однак ця захисно-приспосувальна реакція не є абсолютною: вона “спрацьовує” лише у випадку помірної інтенсивності інвазії¹, тобто такої, за якої організм моллюска-хазяїна у стані протистояти патогенній дії паразитів. У разі генералізованої інвазії захисно-приспосувальні властивості моллюсків блокуються останніми. Це проявляється гальмуванням тих біохімічних процесів, сукупність яких становить собою обмін речовин, і сповільненням перебігу фізіологічних відправлень.

Свинець – отрута локальної дії, котра є високотоксичною для тваринних організмів [7]. Про це свідчать і значення застосовуваних у наш час ГДК, а саме: санітарно-токсикологічна норма становить 0,03, рибогосподарсько-токсикологічна – 0,01 мг/дм³ [4]. Поряд з іншими металами свинець вилучається гідробіонтами з води і накопичується у їх тілі. Це небезпечна отрута, яка за відносно невеликих концентрацій у воді призводить до розвитку в організмах процесів несумісних із життям. Це ілюструється і наведеними нижче результатами даного дослідження.

У середовищі, котре містить йони свинцю у кількості, що відповідає LC_{25} , в усіх досліджених органах і тканинах виявлено зрушення активності лужної фосфатази. У гепатопанкреасі і гемолімфі вони полягають у зростанні активності ферменту у незаражених тварин в 1,8 рази, у інвазованих – в 1,9 і 2,5 рази відповідно ($P = 94,5\%$).

Найбільш масштабними є зрушення цього показника у мантиї: у незаражених витушок його значення зростає у 3,5 рази, а у інвазованих знижується у 14,3 рази ($P > 99,9\%$). Отже, за цієї концентрації токсиканта у середовищі у інвазованих трематодами моллюсків депресивні ознаки з'являються чомусь не у гепатопанкреасі, заселеному паразитами, а у вільній від них мантиї. Гепатопанкреас і гемолімфа нівелюють негативний вплив трематод підвищенням активності лужної фосфатази.

Збільшення концентрації токсиканта до рівня, котрий відповідає значенню LC_{50} , супроводжується різким падінням активності лужної фосфатази у гепатопанкреасі і у гемолімфі. У гепатопанкреасі усіх досліджених моллюсків воно приблизно однакового рівня: зменшення активності фермента у незаражених особин відбувається в 1,4, у інвазованих – в 1,2 рази ($P = 94,5\%$). Причому і у одних, і у других досягнутий рівень активності вищий за такий у тварин контрольної групи. Активність лужної фосфатази у гемолімфі витушок заражених і вільних від інвазії значно різняться: у перших з них падіння її рівня відбувається у 2,5 ($P > 99,9\%$), у других – лише у 2 рази ($P = 94,5\%$). Але в обох випадках за LC_{50} рівень активності фермента, понижуючись, сягає рівня норми (рис. 1, 2).

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

У мантиї найвиразніші зміни показника активності лужної фосфатази відмічено у інвазованих трематодами молюсків. У них її активність зростає в 26 раз ($P > 99,9\%$), тоді як у незаражених лише в 1,7 рази ($P = 95\%$). Тобто для підтримання стабільності гомеостазу за дії на витушок паразитарного чинника необхідна значно більша інтенсивність метаболізму за ту, котра відмічається у незаражених особин.

Подальше збільшення концентрації йонів свинцю у воді не викликає статистично вірогідних змін активності лужної фосфатази ні у гепатопанкреасі, ні у гемолімфі. Натомість у мантиї заражених тварин вона збільшується у 5,6 рази ($P > 99,9\%$), тоді як у незаражених – тільки в 1,8 рази ($P = 94,5\%$).

Висновки

У середовищі, затруєному йонами свинцю у кількості, котра відповідає LC_{25} , спостерігається підвищення активності лужної фосфатази в гепатопанкреасі і у гемолімфі у всіх, без виключення, тварин, а у мантиї – лише у незаражених трематодами особин. Збільшення концентрації токсиканту до рівня LC_{50} супроводжується деяким підвищенням її у всіх досліджених тварин у мантиї і різким падінням (також у всіх тварин) у гепатопанкреасі і гемолімфі. За LC_{75} у гепатопанкреасі і гемолімфі підтримується попередній рівень активності ферменту, а у мантиї він зростає (особливо у інвазованих тварин). За перебування молюсків у токсичному середовищі паразити становлять собою обтяжуючий чинник, котрий пригніблює захисно-приспосувальні можливості інвазованих особин.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому доцільним є дослідити вплив на активність лужної фосфатази у гепатопанкреасі, гемолімфі і мантиї *P. ругрига* розмірно-вагових характеристик молюсків, особливостей займаних ними біотопів, а також видової належності паразитів молюсків – трематод.

Література

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. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии. – Одесса: ОКФА, 1994. – 364 с.
4. 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.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1973. – 343 с.
6. Маляревская А.Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам // Гидробиол. журн. – 1985. – 21, № 3. – С. 70 – 82.
7. Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. – М.: Колос, 1971. – 247 с.
8. Мур Д., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. – М.: Мир, 1987. – 288 с.
9. 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.
10. Hurst C.T., Walker C.A. Increased heat production in a poikilotherm animal in parasitism // Amer. Nat. – 1933. – 69. – P. 461 – 466.
11. 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.