

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 Cd<sup>2+</sup> 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 Cd<sup>2+</sup> 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 Cd<sup>2+</sup> 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/дм<sup>3</sup>): МВК (LC<sub>0</sub>) = 0,1, ЛК<sub>50</sub> (LC<sub>50</sub>) = 5, ЛК<sub>100</sub> (LC<sub>100</sub>) = 100.

У гострому хронічному досліді (експозиція 2 доби) використано концентрації такого ступеня летальності їх для *P. purpura* (мг/дм<sup>3</sup>): ЛК<sub>25</sub> = 1, ЛК<sub>50</sub> = 5, ЛК<sub>75</sub> = 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).

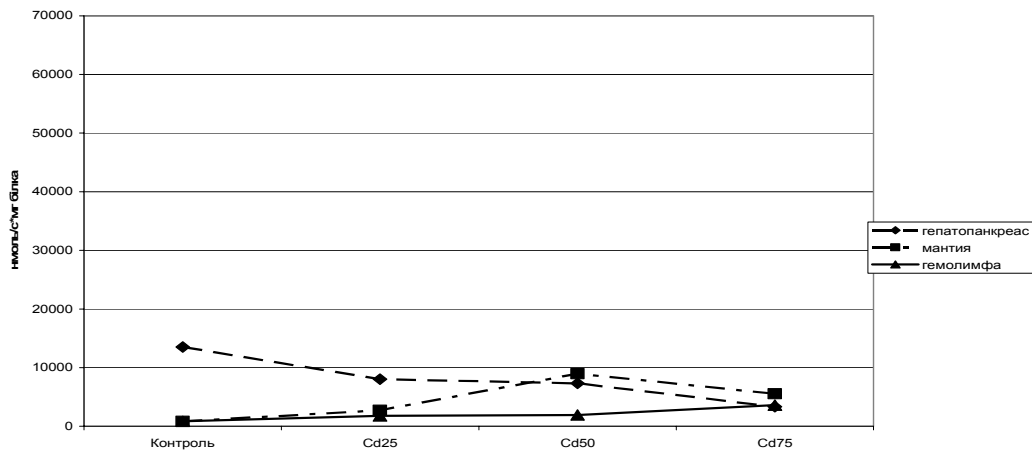


Рис. 1. Активність лужної фосфатази в організмі неінвазованих *P. purpura*

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. purpura* паразитарного чинника відносність цього захисного пристосування полягає в тому, що воно

проявляється тільки у випадку помірної інтенсивності інвазії<sup>1</sup>, 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.

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

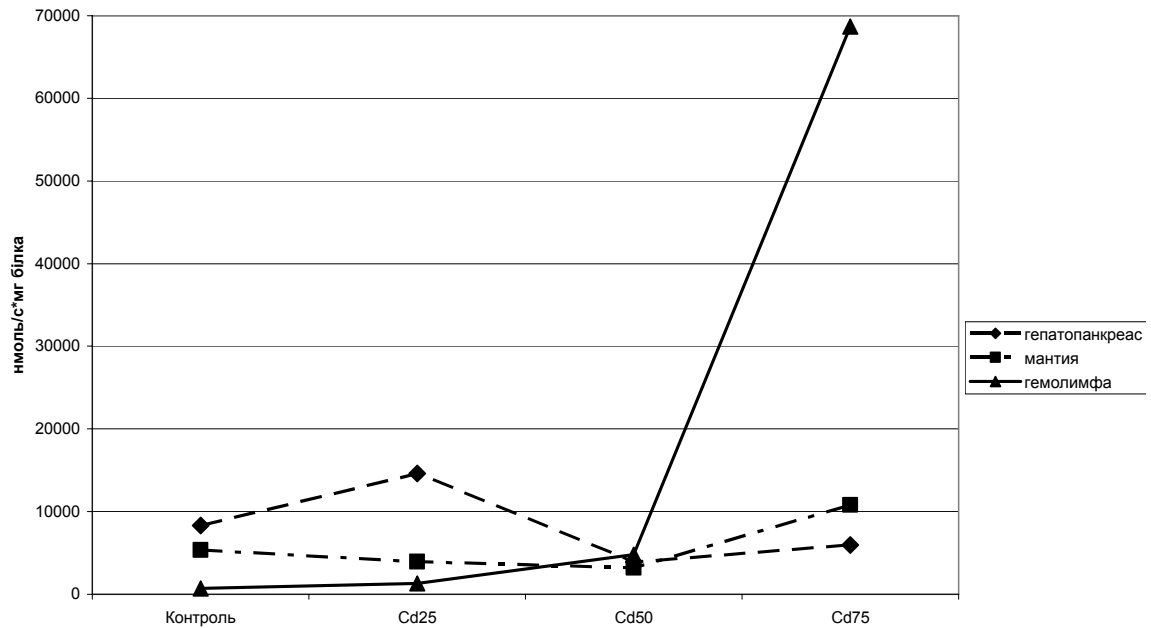


Рис. 2. Активність лужної фосфатази у інвазованих особин *P. purpura*

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 моллюсків 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*<sup>2</sup>. 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/дм<sup>3</sup>). Проте у вкрай невеликих дозах цей елемент відіграє важливу роль у процесах життєдіяльності тварин [5], яку саме конкретно – це належить ще з'ясувати.

<sup>2</sup> 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.