

УДК 576.895.122:594.38:591.5

А. П. Стадниченко

д. б. н.

Г. Є. Киричук

к. б. н.

Житомирський державний університет ім. І. Франка

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, так і внутрішнього середовища їх організму. Для прісноводних червоногих молюсків суттєвими чинниками є паразитарна інвазія і забруднення водного середовища йонами важких металів [8].

Завданням даного дослідження було з'ясування особливостей впливу йонів свинцю і паразитів молюсків (трематод) на активність лужної фосфатази в різних її органах і тканинах. Це завдання зумовлене, по-перше, тим, що у багатьох гідроценозах екстенсивність і інтенсивність інвазії молюсків часом дуже висока. По-друге, зростає вплив йонів важких металів на гідробіонтів, оскільки ці полютанти на початок третього тисячоліття за поширеністю і значимістю для водних організмів вийшли на одне з перших місць [8]. 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), які були зібрані у червні–серпні 2003 і 2004 рр. 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, отримвану 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 аналіза (кожний у триразовій повторності). Цифрові матеріали обробляли методами варіаційної статистики [5].

Як токсикант використовували водний розчин хлориду свинцю $PbCl_2$ (з маркіровкою ч. д. а.), у якому свинець знаходився у найбільш небезпечній [8] для гідробіонтів йонній формі. Токсикологічні досліди поставлені за Алексеевим [1]. Орієнтаційним дослідом (експозиція 2 доби) встановлено значення основних токсикологічних показників: $MBK (LC_0) = 0,1$, $LK_{50} (LC_{50}) = 1$, $LK_{100} (LC_{100}) = 10$ мг/дм³. Потім було підібрано три концентрації для основного токсикологічного дослідження (експозиція 2 доби): 0,5 (LK_{25}), 1 (LK_{50}), 5 (LK_{75}) 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 були відібрані витуши, заражені 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 вища, ніж та у гемолімфі у 3,2 рази ($P = 99,5\%$) і нижча, ніж 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 вона у 4 рази вища ($P = 99,7\%$). 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 молюсків зростають поглинання кисню [11], тепловіддача [12], частота серцебиття [13]. Але ця захисно-приспосувальна реакція не є абсолютною: вона “спрацьовує” лише у випадку помірної інтенсивності інвазії¹, тобто такої, за якої організм молюска-хазяїна може протистояти патогенній дії паразитів. У разі генералізованої інвазії захисно-приспосувальні властивості молюсків блокуються останніми. Це проявляється гальмуванням тих біохімічних процесів, сукупність яких являє собою обмін речовин, і сповільненням перебігу фізіологічних відправлень.

Свинець – отрута локальної дії. Вона 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 LC₂₅, 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 раза, у інвазованих – у 1,9 і 2,5 раза 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 раза (P > 99,9 %). Отже, за цієї концентрації токсиканта у середовищі у інвазованих трематодами молюсків 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, який відповідає значенню LC₅₀, супроводжується різким падінням активності лужної фосфатази у гепатопанкреасі і у гемолімфі. У гепатопанкреасі усіх досліджених молюсків падіння приблизно однакового рівня: зменшення активності фермента у незаражених особин відбувається в 1,4, у інвазованих – в 1,2 раза (P = 94,5 %). Причому і у одних, і у других досягнутий рівень активності вищий, ніж у тварин контрольної групи. Активність лужної фосфатази у гемолімфі витушок заражених і вільних від інвазії значно різниться: 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 LC₅₀ рівень активності фермента, понижуючись, сягає рівня норми (рис. 1, 2). У мантиї

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

найвиразніші зміни показника активності лужної фосфатази відмічено у інвазованих трематодами моллюсків. У них її активність зростає в 26 разів ($P > 99,9 \%$), тоді як у незаражених – лише в 1,7 раза ($P = 95 \%$). Тобто для підтримання стабільності гомеостазу за дії на витушок паразитарного чинника необхідна значно більша інтенсивність метаболізму, ніж та що 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 ($P = 94,5 \%$).

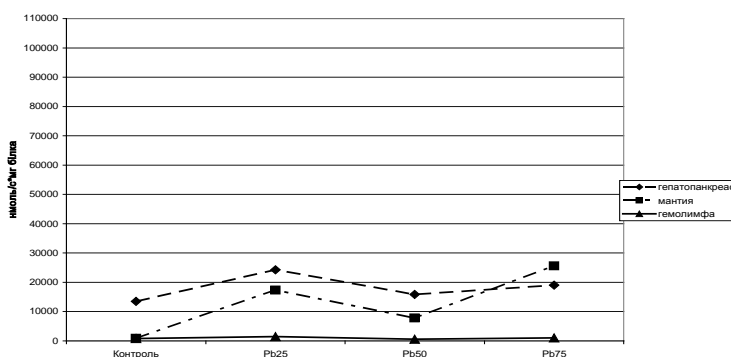


Рис. 1. Активність лужної фосфатази в організмі неінвазованих *P. purpura*

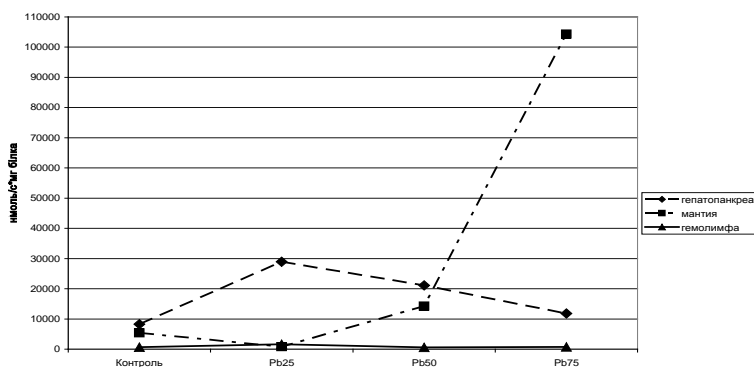


Рис. 2. Активність лужної фосфатази у інвазованих особин *P. purpura*

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). При перебуванні молюсків у токсичному середовищі паразити становлять собою обтяжуючий чинник, котрий пригноблює захисно-приспосувальні можливості інвазованих особин.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому доцільним є дослідити вплив на активність лужної фосфатази у гепатопанкреасі, гемолімфі і мантиї *P. purpura* розмірновагових 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 *Echinostoma 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.