

УДК 576.895.122:594.1

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

Г. Киричук, А. Стадниченко

*Житомирський державний університет імені Івана Франка
вул. В.Бердичівська, 40, Житомир 10008, Україна
e-mail: kyrychuk@zu.edu.ua*

Досліджено вплив трематодної інвазії на активність лужної фосфатази у мантиї, гепатопанкреасі та гемолімфі *Planorbarius purpura* за дії на неї іонів цинку і міді водного середовища. Проаналізовано різницю за цим показником між незараженими особинами у нормі та за перебування моллюсків у розчинах поллютантів, концентрація яких відповідає LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅.

Ключові слова: *Planorbarius purpura*, трематоди, лужна фосфатаза, іони цинку та міді.

Фосфатази - це ферменти з класу гідролаз, які каталізують розщеплення складних ефірів фосфорної кислоти. Містяться вони у клітинах усіх організмів, сприяючи утворенню неорганічного фосфору, необхідного для забезпечення багатьох процесів обміну речовин. Біологічна роль лужної фосфатази пов'язана з участю її в обміні вуглеводів, фосфоліпідів, ДНК і РНК. Рівень активності її у різних органах і тканинах - надійний показник інтенсивності перебігу в них різних метаболічних процесів. Окрім того, він із достатнім рівнем імовірності дає змогу оцінити напрям і силу сукупного впливу на гідробіонтів, у тому числі й на черевоногих моллюсків, таких несприятливих для них чинників, як трематодна інвазія та забруднення середовища іонами важких металів. Актуальність подібного дослідження зумовлена, по-перше, тим, що екстенсивність і інтенсивність інвазії видів родини *Bulinidae* трематодами часто-густо досягають чималих значень. По-друге, антропогенне забруднення водного середовища іонами важких металів на початок третього тисячоліття стало однією з провідних форм його забруднення. До наших днів ці моллюски у згаданому аспекті не досліджувалися.

Матеріал: 87 екз. *Planorbarius purpura* (O.F. Müller, 1774), зібраних у червні-серпні 2004 р. у басейні р. Тетерев (Житомир). Для біохімічних аналізів використано гемолімфу, гепатопанкреас і мантию. Розчини білків отримували шляхом гомогенізування тканин у 0,01 М трис – HCl (рН 7,6). Використовували цитоплазматичну фракцію, котру отримували центрифугуванням гомогенату (20 хв при 8000 об.). Активність лужної фосфатази визначали на фотоелектрокалориметрі КФК-3 за допомогою реакції утворення хіноніміну [4]. Кількість білка при оцінюванні активності ферментів встановлювали за Лоурі. Активність ферменту розраховували в нмоль/с на 1 мг білка. Усього виконано 482 біохімічних аналізи (кожен у триразовій повторності). Цифрові результати опрацьовано методами базової варіаційної статистики [6].

Аби уникнути взаємовпливів катіона з різними аніонами, що могло би спотворити результати дослідження, як токсиканти були використані лише хлориди – CuCl₂·2H₂O і ZnCl₂ (обидва з маркуванням ч.д.а.). Розрахунок концентрацій усіх використаних у дослідженні розчинів здійснено на катіон.

Токсикологічні дослідження поставлено за стандартною методикою [1]. Орієнтаційним дослідом (експозиція – 2 доби) з'ясовано значення основних токсикологічних показників:

Токсикант	МБК(LC ₀)	ЛК ₅₀ (LC ₅₀)	ЛК ₁₀₀ (LC ₁₀₀)
Cu ²⁺	0,001	0,05	1
Zn ²⁺	1	50	100

У гострому досліді (експозиція – 2 доби) використано три концентрації солей металів, які відповідають значенням ЛК₂₅, ЛК₅₀, ЛК₁₀₀.

Токсикант	ЛК ₂₅ (мг/л)	ЛК ₇₅ (мг/л)
Cu ²⁺	0,01	0,1
Zn ²⁺	25	75

Токсичні розчини готували на деклорованій відстоюванням (доба) водопровідній воді (рН 7,2–7,3, температура 18–20°C, вміст кисню 8,5–8,9 мг/л). „Відпрацьовані” розчини заміняли свіжоприготованими щодобово. Контролем слугували моллюски, вміщені у водопровідну деклоровану воду.

Масу моллюсків встановлювали на електронних терезах марки WPS 1200/С. Зараженість тварин партенітами і личинками трематод виявляли мікроскопуванням (×56) тимчасових гістологічних препаратів, виготовлених із тканин їхнього гепатопанкреаса. Для дослідження відібрано моллюсків, заражених редіями і церкаріями трематод родини Echinostomatidae.

У нормі активність лужної фосфатази (нмоль/с·1 мг білка) в мантиї, гемолімфі та гепатопанкреасі *P. purpura* неоднакова. Для неінвазованих особин найменші її значення притаманні гемолімфі – 826,82±152,03. Максимальних значень (13528,94±2907,56) активність лужної фосфатази досягає у гепатопанкреасі, перевищуючи при цьому активність цього фермента в мантиї у 15,6, а в гемолімфі – у 16,4 разу. У тварин, інвазованих трематодами, активність лужної фосфатази утворює такий же ряд (у порядку зменшення значень активності), як і у вільних від зараження особин, а саме: гепатопанкреас→мантия→гемолімфа.

Реакція моллюсків-хазяїв на їхніх паразитів-трематод залежить від сукупності чинників (інтенсивність інвазії, ступінь патогенності паразитів, фізіологічний статус моллюсків, абіотичні чинники довкілля). Зазначимо, що піднесення біохімічної та фізіологічної активності розглядається у заражених моллюсків [2, 7] як прояв неспецифічної захисної пристосувальної реакції, спрямованої на нівелювання впливу ушкоджуючого їх паразитарного чинника. Відзначене нами різке підвищення ступеня активності лужної фосфатази (у 2,1 разу) в мантиї *P. purpura* за помірної інвазії їх трематодами* сприяє підтриманню моллюсками їхньої життєздатності на рівні, достатньому для успішного протистояння паразитам. Про підвищення рівня загального обміну у помірно заражених трематодами особин свідчать також зростання поглинання моллюсками кисню [10] і тепловіддачі [11], а також пригнічення ритму серцевих скорочень [12]. За наявності поодиноких паразитів у гепатопанкреасі моллюсків ця реакція не відбувається через вкрай слабкий патогенний їхній вплив на хазяїв. Відсутність такої реакції за тотального ураження гепатопанкреаса моллюсків трематодами зумовлюється іншими причинами, перш за все – значним пригніченням захисних пристосувальних властивостей моллюсків, уражених цими червами. Інтенсивність загального обміну речовин за цих обставин падає нижче оптимального для них рівня. Частковим проявом цього процесу є і зменшення (нижче норми) активності лужної фосфатази в їхній мантиї.

* Ураження паразитами від 10 до 50% об'єму гепатопанкреаса.

Відомо [3], що перебування тварин у токсичному середовищі супроводжується розвитком у них патологічного процесу, викликаного отруєнням, котрий характеризується фазним характером. Фази його йдуть слідом одна за одною в такому порядку: 1) байдужість (концентрація токсиканта не досягає порогового рівня); 2) підвищення активності (захисно-приспосувальні можливості організму повністю перекривають шкідливий вплив токсиканта); 3) депресія (пригнічення захисно-приспосувальних властивостей за досить тривалого збереження особинами життєздатності); 4) сублетальна (стан правдивого шоку); 5) летальна. Нами проаналізовано переважно ті дані, котрі стосувалися тварин, які перебували на третій і четвертій фазі та лише зрідка – на другій фазі патологічного процесу.

Відзначимо, що використані як токсиканти сполуки цинку і міді були представлені в розчинах у найбільш токсичній для гідробіонтів [8] іонній формі. У малих дозах ці мікроелементи необхідні для нормальної їхньої життєдіяльності [9]. Вони сприяють росту і розмноженню цих тварин, оскільки входять до складу активних центрів окисно-відновлювальних ферментів [5].

У середовищі, затруєному іонами цинку в концентрації, що відповідає LC_{25} , у вільних від інвазії особин відзначено зростання активності лужної фосфатази в мантиї (у 12,0 разів) на фоні різкого падіння її у гемолімфі (у 2,3 разу) і у гепатопанкреасі (у 4,2 разу; ($P^* > 99,9\%$)). За LC_{50} згадані вище тенденції щодо мантиї та гепатопанкреасу зберігаються, що виразно (у формі піків) відображено на графіках (рис. 1). Найбільше зростання активності ферменту зареєстроване для гемолімфи (у 7,6 разу), а найменше – для мантиї (у 6,6 разу). За LC_{75} в усіх підданих аналізу органах і тканинах має місце спад його активності.

За трематодної інвазії найменша з використаних у дослідях концентрацій іонів цинку викликає зниження активності лужної фосфатази у гемолімфі – в 1,7 та у гепатопанкреасі – у 7,4 разу; ($P > 99,9\%$). Натомість підвищення ступеня токсичності розчину до рівня LC_{50} спричинює зростання її активності. Причому у гемолімфі та гепатопанкреасі вона зростає на 10–15% від контролю, а у мантиї – в 6,6 разу ($P > 99,9\%$). За LC_{75} у середовищі активність лужної фосфатази різко знижується порівняно з нормою як у мантиї (у 3,9 разу), так і у гепатопанкреасі (у 2,9 разу).

За експозиції *P. purpura* у розчинах, концентрація іонів міді та цинку в яких відповідає LC_{25} , зростання активності лужної фосфатази охоплює неоднакову кількість органів і тканин. У середовищі, затруєному іонами цинку, зростання активності цього ферменту спостерігається лише у мантиї, тоді як у середовищі, котре містить іони міді, – у мантиї (в 2,1 разу) і у гепатопанкреасі (в 1,4 разу) ($P > 99,9\%$).

За LC_{50} і в гемолімфі, і в гепатопанкреасі відбувається зниження активності досліджуваного ферменту (в 11 разів проти попередньої концентрації; $P > 99,9\%$) і більш плавне (в 1,1 разу) – у гемолімфі ($P = 95\%$). У мантиї ж активність лужної фосфатази перевищує норму в 7,3 разу ($P > 99,9\%$).

В інвазованих трематодами особин застосовані у дослідях концентрації іонів цинку викликають в усіх обстежених органах зміни однакового характеру (порівняно з незараженими тваринами). У них, однак, вони набагато яскравіше виражені, ніж у вільних від інвазії молюсків. На діаграмі (рис. 1) це знайшло своє відображення як у крутіших підйомах і спадах стовпчиків, так і в більш високо піднесених їхніх піках.

Іони міді відзначаються більшою токсичністю для гідробіонтів, отже, і для *P. purpura*, ніж іони цинку. Про це свідчать і значення застосовуваних наразі гранично

* P - ступінь достовірності.

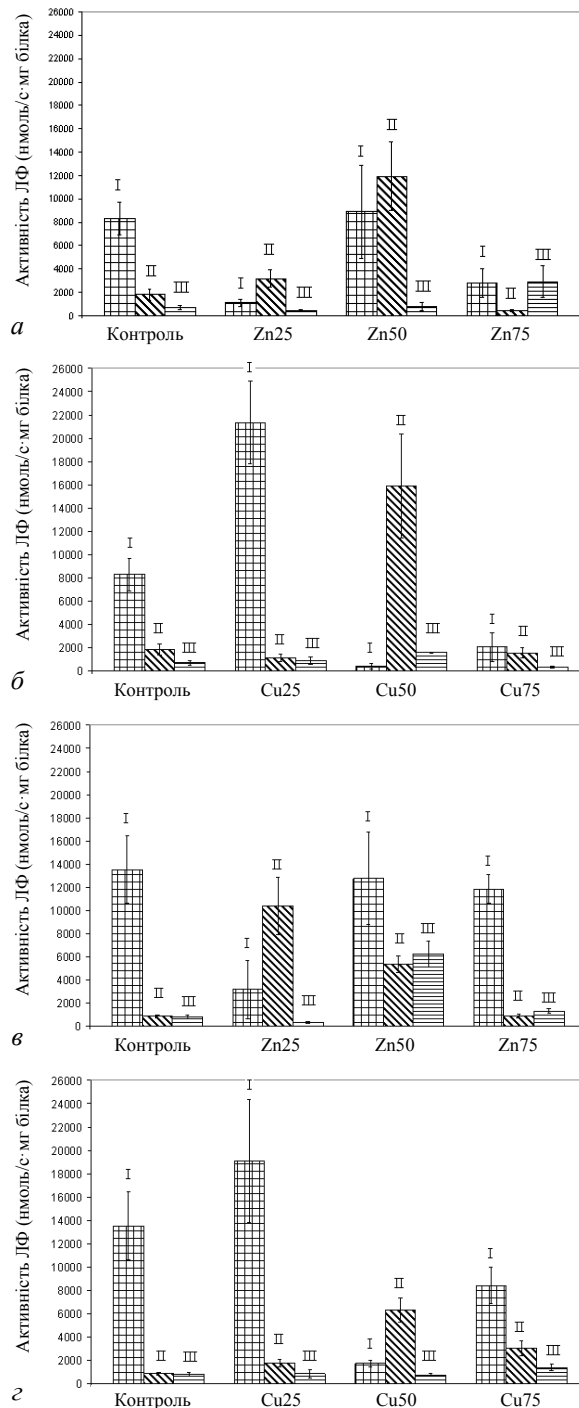


Рис. 1. Вплив трематодної інвазії на активність лужної фосфатази в різних органах і тканинах *Planorbarius purpura* за дії на неї іонів міді та цинку: а, в – інвазовані особини; б, г – неінвазовані особини; I – гепатопанкреас, II – мантия, III – гемолімфа.

допустимих концентрацій (ГДК) рибогосподарського призначення*. Вони дорівнюють 0,001 мг/дм³ для іонів міді та 0,01 мг/дм³ – для іонів цинку [5]. Про те ж саме свідчать і отриманні нами значення LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅ за застосування як токсикантів іонів цих двох важких металів. Адже якщо для іонів цинку LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅ перевищують ГДКр у 25 000, 50 000, 75 000 разів відповідно, то для іонів міді такі перевищення становлять усього лише 10, 50, 100 разів.

Підкреслимо, що за смертності 25, 50, 75% в кожній із цих груп у наших дослідах серед загиблих тварин переважали інвазовані трематодами особини. Причому частка їх зі збільшенням концентрації розчинів неухильно зростала. Так, за LC₂₅ вони становили 61–73%, за LC₅₀ – близько 85, за LC₇₅ – 89–97% від загальної кількості експонованих у розчинах токсикантів особин. Це ще раз свідчить про те, що заражені трематодами молюски більш вразливі та менш витривалі щодо впливу на них токсичних чинників, ніж тварини незаражені.

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. К.: 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: ОК-ФА, 1994. 364 с.
5. *Гусева Т. В., Молчанова Я. П., Заша Э. А.* и др. 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. Т. 21. № 3. С. 70–82.
8. *Мур Д., Рамамурти С.* Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. М.: Мир, 1987. 288 с.
9. *Романенко В. Д.* Основи гідроекології. К.: Обереги, 2001. 728 с.
10. *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. Vol. 29. N 14. P. 321–404.
11. *Hurst C. T., Walker C. A.* Increased heat production in a poikilotherm animal in parasitism // Amer. Nat. 1933. Vol. 69. P. 461–466.
12. *Lee F. O., Cheng C. T.* Increased heart rate in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni* // J. Invertebr. Pathol. 1970. Vol. 16. N 1. P. 148–149.

* ГДК, розраховані для риб і безхребетних тварин, які входять до складу їхньої кормової бази.

THE INFLUENCE OF TREMATODE INVASION ON THE ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN THE VARIOUS ORGANS AND TISSUES OF THE HORN COIL (MOLLUSCA: GASTROPODA: PULMONATA: BULINIDAE) UNDER AFFECT OF HEAVY METALS IONS OF THE WATER ENVIRONMENT

G. Kirichuk, A. Stadnychenko

*Ivan Franko State University of Zhytomyr
40, V. Berdychivska St., Zhytomyr 10008, Ukraine
e-mail: kyrychuk@zu.edu.ua*

The influence of trematode invasion on the activity of alkaline phosphatase in the various organs and tissues of the gastropod mollusk, *Planorbarius purpura* under affect of heavy metals ions of the water environment have been investigated. The distinctions between infected and non- infected individuals under normal conditions and under affect of the solutions of heavy metals (concentrations – LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅) have been analyzed.

Key words: trematode invasion, *Planorbarius purpura*, heavy metals, alkaline phosphatase.

ВЛИЯНИЕ ТРЕМАТОДНОЙ ИНВАЗИИ НА АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КАТУШКИ (MOLLUSCA: GASTROPODA: PULMONATA: BULINIDAE) ВСЛЕДСТВИЕ ДЕЙСТВИЯ НА НЕЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Г. Киричук, А. Стадниченко

*Житомирский государственный университет имени Ивана Франко
ул. Б. Бердычевская, 40, Житомир 10008, Украина
e-mail: kyrychuk@zu.edu.ua*

Исследовано влияние трематодной инвазии на активность щелочной фосфатазы в мантии, гепатопанкреасе и гемолимфе *Planorbarius purpura* вследствие действия на нее ионов цинка и меди водной среды. Проанализирована разница этих показателей между незараженными особями в норме и вследствие пребывания моллюсков в растворах поллютантов, концентрация которых соответствует LC₂₅, LC₅₀, LC₇₅.

Ключевые слова: *Planorbarius purpura*, трематоды, щелочная фосфатаза, ионы цинка и меди.

Стаття надійшла до редколегії 01.12.08

Прийнята до друку 05.02.09