

УДК 574.64:577.122+594.38
<https://doi.org/10.33989/2414-9810.2019.5.2.194418>

Г.Є.Киричук¹, Л.В.Музика²

Житомирський державний університет імені Івана Франка
вул. Велика Бердичівська, 40, Житомир, 10002, Україна
kyrychuk@zu.edu.ua

¹ORCID 0000-0002-1059-2834

²ORCID 0000-0001-7752-7853

ХРОНІЧНА ДІЯ НИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ДЕЯКИХ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ПОКАЗНИКИ БІЛКОВОГО ОБМІНУ *Lymnaea stagnalis*

*Досліджено хронічну (14 діб) дію низьких концентрацій (2 ГДК) іонів важких металів (купруму, цинку, кадмію та плюмбуму) на зміни вмісту окремих метаболітів білкового обміну (альбумінів, глобулінів та білкового індексу) в гемолімфі, гепатопанкреасі та мантиї прісноводних молюсків *Lymnaea stagnalis*.*

Ключові слова: прісноводні молюски, альбуміни, глобуліни, білковий індекс, іони кадмію, іони цинку, іони плюмбуму, іони купруму.

Вступ. Серед п'яти класів речовин, що виокремлені як пріоритетні токсиканти за переважною зустрічальністю та екологічною небезпекою (Оксиюк и др., 1993), сполуки важких металів посідають чільне місце. Вони впливають на якість водного середовища та функціонування водних екосистем (Линник, 1999). Вальовий вміст важких металів (Брагинский, Комаровский, & Линник, 1989), у внутрішніх водоймах України зростає з року в рік, часто значно перевищуючи їх гранично допустимі концентрації як санітарно-гігієнічні, так і рибогосподарські. З'ясовано, що водяні тварини, угруповання і екосистеми дуже чутливі до зміни хімічного складу водного середовища, особливо, до впливу іонів металів (Христофорова, 1989; Романенко, 2004; Киричук, 2011; Khangarot, & Ray, 1988). Встановлено, що гідробіонти здатні накопичувати важкі метали в кількостях, які у сотні (ферум), тисячі (купрум, кадмій) і сотні тисяч (цинк, манган) разів перевищують їх концентрації у воді (Комаровский, & Полищук, 1981). Відомо також (Ковальський, 1974), що водяні організми, концентруючи мікроелементи, забезпечують тим самим нормальний синтез біологічно активних речовин типу ферментів, гормонів і вітамінів. Однак при концентраціях, що перевищують нормальний їх вміст, в організмі втрачається межа між їх фізіологічною і токсичною дією металів (Горовая, & Столярова, 1987). Крім цього, поряд з прямою токсичною дією, іони металів викликають небезпечні віддалені наслідки, а саме: мутагенний, ембріотоксичний, гонадотоксичний та інші ефекти (Атаев, & Полевщиков, 2004; Devi, 1971).

Як зазначалося (Христофорова, 1989), на організмовому рівні дія токсикантів призводить до змін хімічного складу, морфологічних характеристик клітин, осмотичних функцій, виникнення й утворення патологічних форм, мутацій, порушення дихання та орієнтації гідробіонтів у просторі. Все це призводить до патологічної зміни генетичних, біохімічних, фізіологічних, морфологічних, етологічних, екологічних характеристик популяції.

Плюмбум і кадмій належить до класу ксенобіотиків, а купрум і цинк в малих кількостях є мікроелементами (Патин, 1983; Давыдов, & Тагасов, 2002). Дослідження хронічного впливу малих концентрацій зазначених іонів на особливості білкового обміну в організмі прісноводних молюсків дозволить прогнозувати стан малакоценозів за певного рівня антропогенного (зокрема, токсичного) навантаження на гідроекосистеми та передбачати зміни в самих екосистемах.

Матеріал і методики дослідження. В експерименті використано 146 екз. однорозмірних *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (з розмірними характеристиками: висота черепашки – $38,614 \pm 0,127$ мм, маса молюска – $3,785 \pm 0,108$ г) зібрані у липні 2017 рр. у двох водоймах (басейн р. Гуїва смт. Озерне Житомирського району та р. Коднянка с. Старий Солотвін Бердичівського району). Протягом 14 діб особин по 10 екз. утримувалися у дехлорованій водопровідній воді (рН 7,3–7,7; температура – 18–20°C; вміст кисню – 7,0–8,2 мг/дм³, об'єм – 5 л). Для дотримання чистоти експерименту і запобігання хронічного впливу власних екзометаболітів у акваріумах щодоби змінювали воду.

У токсикологічному досліді проведеному за методикою (Алексеев, 1981) досліджено солі металів з однойменним аніоном: $ZnCl_2$, $PbCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ марки ч.д.а. Розрахунок концентрацій здійснювали на катіон. Використані концентрації відповідають 2 ГДК_{рибгосподарське}. Токсичне середовище змінювали кожну добу. Експозиція – 14 діб.

Для біохімічних досліджень використовували гепатопанкреас, мантию та гемолімфу. Останню отримували за методикою Таргетта (Алякринская, 1974) в модифікації Стадниченко (Архипчук, Стадниченко, & Иваненко, 1994) безпосередньо перед дослідженням. Масу молюсків та органів вимірювали на електронних вагах WPS 1200/C. У досліді використанні неінвазовані особини.

Для визначення вмісту метаболітів готували тканинні екстракти в екстрагуючому середовищі 0.1 М трис-HCl (рН 7,6). Вміст альбумінів визначали за методикою описаною (Киричук, 2009), глобулінів – за Маклагеном (Киричук, 2009) (обраховано в одиницях – SH). Білковий індекс розраховували як альбуміново-глобулінове співвідношення. Всього здійснено 876 біохімічних аналізів в трьохкратній повторності. Інтенсивність забарвлення кінцевих продуктів в усіх випадках визначали фотометрично на КФК-3.

Отримані результати піддавали статистичній обробці за загальноприйнятою методикою з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження. При вивченні короткотривалої дії низьких концентрацій (LK^{48}_{25}) іонів важких металів (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) на вміст альбумінів, глобулінів та показник білкового індексу в різних тканинах та органах прісноводного черевоногого молюска *Planorbarius purpura* було з'ясовано (Киричук, 2011), що дія цих іонів на білки у кожній з досліджених тканин цих тварин була багатовекторною і характеризувалася загальним регуляторно-токсичним принципом дії (Киричук, & Grubinko, 2009). У зв'язку з цим виникала потреба проаналізувати особливості дії іонів купруму, кадмію, плюмбуму та цинку на типового представника прісноводних гідроценозів який, на відміну від *P. purpura*, характеризується іншими екологічними спектрами. Крім того, *L. stagnalis* досить часто використовують як індикаторний вид стану навколишнього середовища. Саме тому ми проаналізували досліджувані показники взявши тварин для експерименту з двох різних водойм при цьому зберігши інші рівні умови в експерименті (розмірність, масу, період акламації).

Купрум входить до складу низки ферментів (цитохромоксидази, діамінооксидази, уратоксидази, сульфідтрансферази та ін.) та купрумвмісних білків, бере участь у процесах тканинного дихання, кровотворення, сперматогенезу, синтезу фосфоліпідів, фенольного обміну, виступає як каталізатор окисно-відновних реакцій, впливає на структуру та функції нуклеїнових кислот (Мур, & Рамамурти, 1987).

Цинк входить до складу карбоангідраз, дегідрогеназ, фосфатаз, протеїназ, пептидаз та ферментів нуклеїнового обміну, відіграє суттєву роль в механізмах спадковості через участь в стабілізації рибосом і біополімерів. Від кількості цинку в організмі залежать особливості протікання у м'язовій тканині гліколітичних та окиснювальних процесів (Горовая, & Столярова, 1987). Для металів, що не виконують в організмі фізіологічних функцій (кадмію, плюмбум), відзначається невисокий рівень регуляції їх надходження (Горовая, & Столярова, 1987). Відомо (*Научные обзоры советской литературы*, 1984), що кадмій виступає антагоністом іону цинку, що призводить до заміщення останнього в біологічних структурах та порушенні ензиматичних процесів.

У зв'язку із зазначеним, слід очікувати суттєвого впливу досліджуваних катіонів на вміст метаболітів білкового обміну.

Порівняльний аналіз вмісту білкових фракцій (альбумінів та глобулінів) в організмі ставковика озерного з різних біотопів. (контрольних групах тварин) в гемолімфі, мантиї та гепатопанкреасі показав, що досліджені показники є величинами одного порядку (рис. 1-3) і між їх значеннями статистично достовірної похибки не виявлено. Разом з тим спостерігається тенденція до зниження (15%) білкового індексу в гепатопанкреасі у особин з популяції р.Гуйва (рис. 4), що в свою чергу свідчить про стимуляцію синтезу альбумінів в гепатопанкреасі молюсків. При хронічній дії низьких (2 ГДК) концентрацій досліджених іонів на особин з обох популяцій у мантиї та гепатопанкреасі відмічено пригнічення синтетичних процесів, що проявляється в зниженні на 14,0-36,5% вмісту глобулінів та падіння показників вмісту альбумінів за дії іонів купруму, кадмію та плюмбуму (до 52%) в гемолімфі та зростання обговорюваного показника за дії іонів цинку (в 2,7 рази). Разом з тим найбільш інформативним показником проходження обмінних процесів є білковий індекс. Падіння зазначеного індексу може свідчити про зменшення вмісту альбумінів або ж збільшення кількості глобулінів. Це в свою чергу може бути причиною порушення синтетичної функції гепатопанкреаса і підвищення синтезу деяких фракцій глобулінів, як відповідь організму на розвиток патологічних процесів.

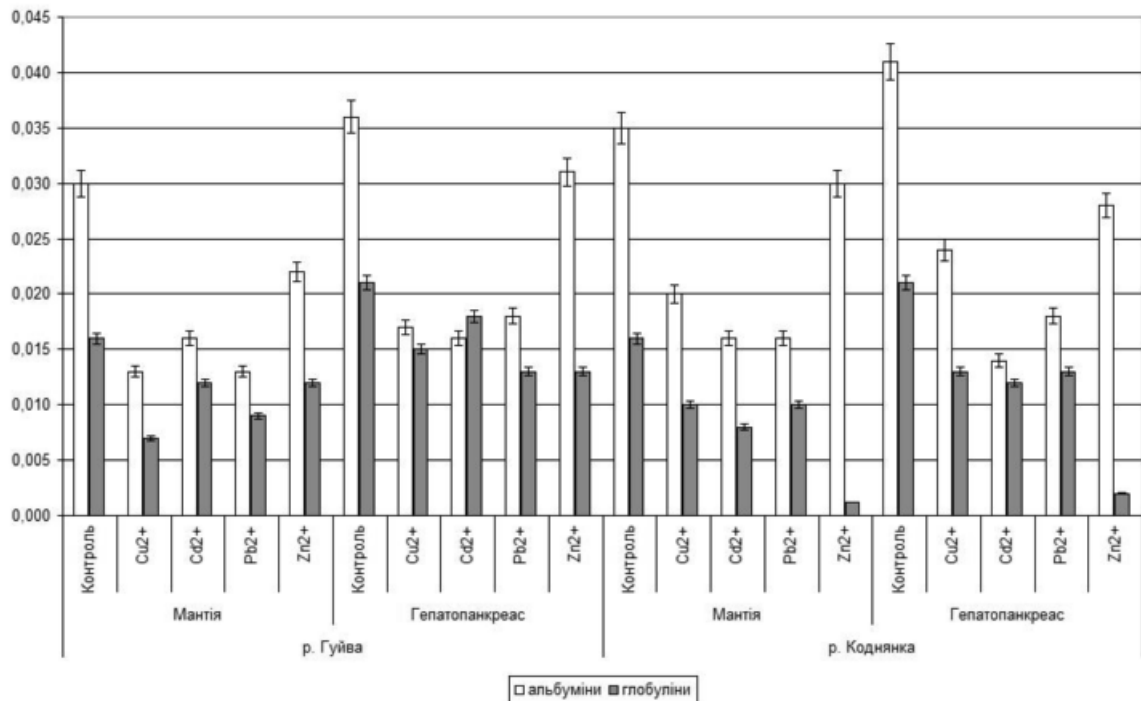


Рис.1. Динаміка вмісту альбумінів (г/г) та глобулінів (-SH/г) в тканинах та органах *Lymnaea stagnalis*

Виявлене нами зростання вмісту альбумінів за низьких концентрацій цинку може бути адаптивними і здійснюється з метою виведення металу з організму молюсків. Надмірна інтоксикація іонами цинку призводить до адаптаційно-енергетичного окиснення білків і амінокислот (Христофорова, 1989; Синюк, Курант, & Грубинко, 2003), що позначається на зниженні їх гомеостатичного рівня у гемолімфі, яка відображає загальний адаптивний статус організму тварин. Аналогічна тенденція практично характерна і для глобулінів, проте зниження їх вмісту за дії цинку у високих концентраціях може мати не стільки захисний, скільки деградаційний характер. В цілому, у молюсків за дії іонів цинку в невисоких концентраціях (2 ГДК) за зменшення білкового індексу, ймовірно, зростає роль глобулінів як захисних та гомеостатичних білків первинного захисту тканин, насамперед, гемолімфи. Однак за подальшої інтоксикації молюсків іонами цинку водного середовища при збільшенні величини білкового індексу основну адаптоформуючу роль на себе беруть альбумінові білки, що здатні не тільки виводити цинк та

транспортувати метаболіти, а й служити енергетичним матеріалом в умовах хронічного енергетичного дефіциту, пов'язаного зі значними енергетичними витратами для формування захисних систем організму в цілому (Панин, 1983; Sanders, & Martin, 1993). Подібна закономірність за інтоксикації іонами важких металів характерна і для інших гідробіонтів (Синюк, Курант, & Грубинко, 2003). З іншого боку, зміна величини білкового коефіцієнту може бути пов'язана з активацією за інтоксикацією цинком апоптозу клітин (Samali, & Cotter, 1996).

Отже, на підставі дослідження білкового складу тканин та їх білкового коефіцієнту в цілому можна прогнозувати посилення негативного впливу іонів цинку на молюсків зі зростанням їх концентрації у воді.

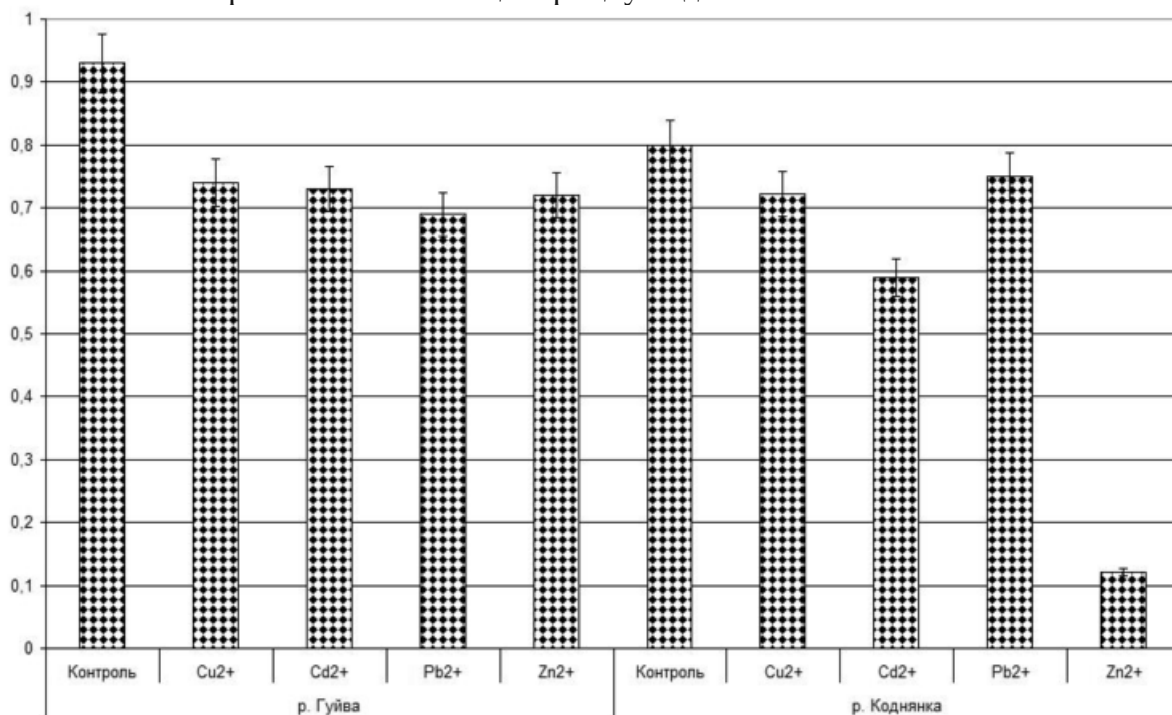


Рис.2. Вміст глобулінів (-SH/a) в гемолімфі *Lymnaea stagnalis* за дії іонів важких металів

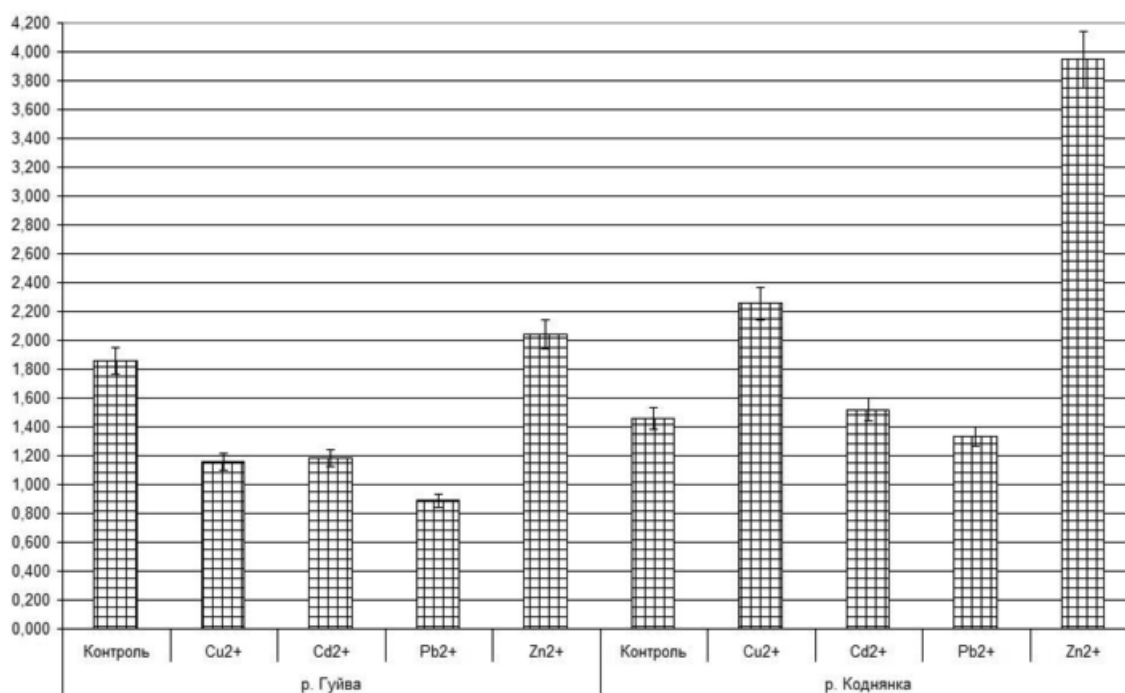


Рис. 3 Вміст альбумінів (г/л) в гемолімфі *Lymnaea stagnalis* за дії іонів важких металів

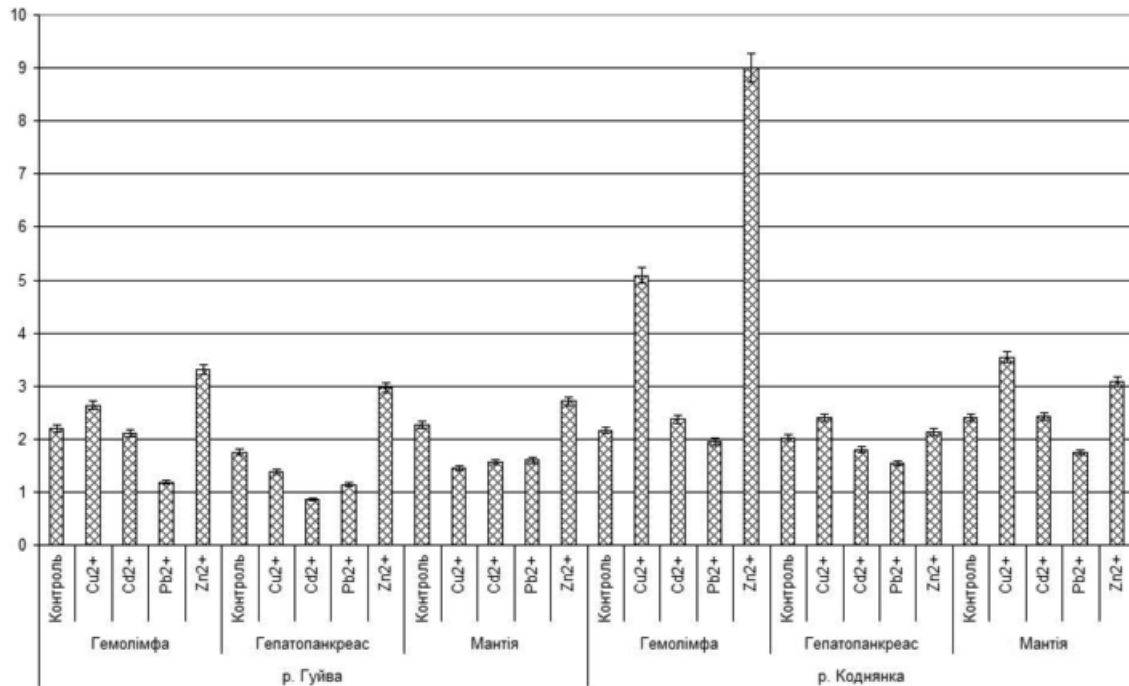


Рис.4 Динаміка показників білкового індексу (альбуміни/глобуліни) в тканинах та органах *Lymnaea stagnalis*

Висновки. Білкова система тканин молюсків швидко реагує на зміну лімітуючого чинника водного середовища, яким є іони металів.

На підставі білкового складу тканин та білкового коефіцієнту в цілому можна прогнозувати посилення негативного впливу іонів на молюсків зі зростанням їх концентрації у воді.

Список використаної літератури:

- Алексеев В. А. Основные принципы сравнительно токсикологического эксперимента. *Гидробиологический журнал*. 1981. Т. 17, № 3. С. 92–100.
- Алякринская И. О. О гемоглобине гемолимфы беломорских астарт. *Зоологический журнал*. 1974. № 9. С. 1304–1307.
- Архипчук С. В., Стадниченко А. П., Иваненко Л. Д. Влияние последствия СМС «Ландыш» на легочное и кожное дыхание прудовика озерного, инвазированного трематодами, при разном температурном режиме. *Деп. в ГНТБ України*. 05.08.1994. № 1527. Ук 94. 20 с.
- Атаев Г. Л., Полевщиков А. В. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. 1–Клеточные реакции. *Паразитология*. 2004. Вып. 38 (4). С. 342–351.
- Брагинский Л. П., Комаровский Ф. Я., Линник П. Н. Эколого-токсикологическая ситуация в водной среде (основные принципы оценки и прогнозирования). *Гидробиологический журнал*. 1989. Т. 25, № 6. С. 91–101.
- Горова С. Л., Столярова С. А. Физиолого-биохимические показатели рыб водоёмов Белоруссии. Москва : Наука и техника, 1987. 157 с.
- Давыдов С. Л., Тагасов В. И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века. Москва : РУДН, 2002. 140 с.
- Киричук Г. Е. Физиолого-біохімічні механізми адаптації прісноводних молюсків до змін біотичних та абіотичних чинників водного середовища : автореф. дис. ... д-ра біолог. наук. спец. «Гідробиологія». Київ, 2011. 45 с.
- Киричук Г. Е. Вміст білків у тканинах витушки пурпурної (Mollusca : Gastropoda : Pulmonata : Vulinidae) за дії іонів металів. *Доповіді НАНУ*. 2009. № 1. С. 161–167.
- Ковальский В. В. Геохимическая экология. Москва : Наука, 1974. 299 с.
- Комаровский Ф. Я., Полищук Л. Р. Ртуть и другие тяжелые металлы в водной среде: миграции, накопление, токсичность для гидробионтов: обзор. *Гидробиологический журнал*. 1981. Т. 17, № 5. С. 71–83.
- Комплексная экологическая классификация качества поверхностных вод суши / О. П. Оксик и др. *Гидробиологический журнал*. 1993. Т. 29, № 4. С. 62–76.
- Линник П. Н. Донные отложения водоемов как потенциальный источник вторичного загрязнения водной среды соединениями тяжелых металлов. *Гидробиологический журнал*. 1999. Т. 35, № 2. С. 97–109.
- Мур Дж., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. Москва : Мир, 1987. 288 с.
- Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ: Москва, 1984. Вып. 69: Кадмий. 59 с.
- Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск : Наука, 1983. 234 с.
- Патин С. А., Морозов Н. Н. Микроэлементы в морских организмах и экосистемах. Москва, 1981. 153 с.
- Романенко В. Д. Основы гидроэкологии. Киев : Генеза, 2004. 664 с.
- Синюк Ю. В., Курант В. З., Грубинко В. В. Влияние тяжелых металлов на качественный и количественный состав белков сыворотки крови карпа. *Гидробиологический журнал*. 2003. Т. 39, № 3. С. 56–64.
- Христофорова Н. К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. Ленинград : Наука, 1989. 192 с.
- Devis L. T. Metyl mercury in fish. Stockholm : FAO, 1971. 364 p.
- Khangarot B. S., Ray P. K. Sensitivity of freshwater pulmonate snails, *Lymnaea luteola* L., to heavy metals. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1988. No. 41. P. 208–213.

- Kirichuk G. Ye., Grubinko V. V. Peculiarities of the Protein Metabolism in Gastropoda (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) under Trematoda Infestation. *Hydrobiological Journal*. 2009. Vol. 45, No. 1. P. 109–120.
- Samali A., Cotter T. G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Experimental Cell Research*. 1996. Vol. 223, no. 1. P. 163–170.
- Sanders B. M., Martin L. S. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Science of the Total Environment*. 1993. Vol. 139/140. P. 459–470.

G. Ye. Kyrychuk, L.V. Muzyka

Zhytomyr Ivan Franko State University, Zhytomyr, Ukraine

CHRONIC ACTION OF LOW CONCENTRATIONS OF SOME OF HEAVY METALS ON THE PROTEIN EXCHANGE INDICATORS OF LYMNAEA STAGNALIS

Chronic (14 days) effect of low concentrations (2 MPC) of heavy metal ions (cuprum, zinc, cadmium and plumbum) on changes in the content of individual metabolites of protein metabolism (albumins, globulins and protein index) in hemolymph, hepatopanialis and mAb.

Key words: freshwater molluscs, albumins, globulins, protein index, cadmium ions, zinc ions, plumbum ions, cuprum ions.

References

- Alekseev, V. A. (1981). Osnovnye principy sravnitel'no toksikologicheskogo jeksperimenta [Basic principles of a comparative toxicological experiment]. *Hydrobiological Journal*, 17(3), 92-100 [in Russian].
- Aljakrinskaja, I. O. (1974). O gemoglobine gemolimfy belomorskih astart [About hemoglobin hemolymph of White Sea astarte]. *Zoologicheskij zhurnal [Zoological Journal]*, 9, 1304-1307 [in Russian].
- Arhipchuk, S. V., Stadnichenko, A. P., & Ivanenko, L. D. (1994). Vlijanie posledstvija SMS «Landysh» na legochnoe i kozhnoe dyhanie prudovika ozernogo, invazirovanogo trematodami, pri raznom temperaturnom rezhime [Effect of the effects of SMS "Landish" on pulmonary and skin respiration of a lake pond, invaded by trematodes, at different temperature conditions]. *Dep. v GNTB Ukrainy [Dep. in SSTL of Ukraine]*. 05.08.1994. № 1527. Uk. 94 [in Russian].
- Ataev, G. L., & Polevshnikov, A. V. (2004). Zashhitnye reakcii brjuhonogih molljuskov. 1–Kletochnye reakcii [Protective reactions of gastropods 1 – Cellular Reactions]. *Parazitologiya*, 38(4), 342-351 [in Russian].
- Braginskij, L. P., Komarovskij, F. Ja., & Linnik, P. N. (1989). Jekologo-toksikologicheskaja situacija v vodnoj srede (osnovnye principy ocenki i prognozirovanija) [Ecological and toxicological situation in the aquatic environment (basic principles of assessment and forecasting)]. *Hydrobiological Journal*, 25(6), 91-101 [in Russian].
- Davydov, S. L., & Tagasov, V. I. (2002). Tjzhelye metally kak supertoksikanty XXI veka [Heavy metals as supertoxicants of the 21st century]. Moskva: RUDN [in Russian].
- Devis, L. T. (1971). *Metyl mercury in fish*. Stockholm: FAO.
- Gorovaja, S. L., & Stoljarova, S. A. (1987). Fiziologo-biohimicheskie pokazateli ryb vodojmov Belorussii [Physiological and biochemical indicators of fish in water bodies of Belarus]. Moskva: Nauka i tehnika [in Russian].
- Hristoforova, N. K. (1989). Bioindikacija i monitoring zagrjaznenija morskij vod tjzhelymi metallami [Bioindication and monitoring of heavy metal pollution of sea water]. Leningrad: Nauka [in Russian].
- Khargarot, B. S., & Ray, P. K. (1988). Sensitivity of freshwater pulmonate snails, *Lymnaea luteola L.*, to heavy metals. *Bull Environ Contam Toxicol*, 41, 208-213.
- Kirichuk, G. Ye., & Grubinko, V. V. (2009). Peculiarities of the Protein Metabolism in Gastropoda (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) under Trematoda Infestation. *Hydrobiological Journal*, 45(1), 109-120.
- Komarovskij, F. Ja., & Polishhuk, L. R. (1981). Rtut' i drugie tjzhelye metally v vodnoj srede: migracii, nakoplenie, toksichnost' dlja gidrobiontov: obzor [Mercury and other heavy metals in the aquatic environment: migration, accumulation, toxicity to aquatic organisms: an overview]. *Hydrobiological Journal*, 17(5), 71-83 [in Russian].
- Koval'skij, V. V. (1974). *Geohimicheskaja jekologija [Geochemical ecology]*. Moskva : Nauka [in Russian].
- Kyrychuk, H. Ye. (2009). Vmist bilkiv u tkanyakh vytyshky purpurnoi (Mollusca : Gastropoda : Pulmonata : Bulinidae) za dii ioniv metaliv [Protein content in purple tissue (Mollusca : Gastropoda : Pulmonata : Bulinidae) by the action of metal ions]. *Dopovidi NANU [Reports of NASU]*, 1, 161-167 [in Ukrainian].
- Kyrychuk, H. Ye. (2011). Fiziologo-biohimichni mehanizmy adaptatsii prysnovodnykh moljuskiv do zmin biotychnykh ta abiotychnykh chynnnykh vodnoho seredovyscha [Physical and biological mechanisms of adaptation of freshwater mollusks to winter biotic and abiotic factors of the aquatic environment]. (Extended abstract diss.) Kyiv [in Ukrainian].
- Linnik, P. N. (1999). Donnje otlozhenija vodoemov kak potencial'nyj istochnik vtorichnogo zagrjaznenija vodnoj srede soedinenijami tjzhelyh metallov [Bottom sediments of reservoirs as a potential source of secondary pollution of the aquatic environment with compounds of heavy metals]. *Gidrobiologicheskij zhurnal*, 35(2), 97-109 [in Russian].
- Mur, Dzh., & Ramamurti, S. (1987). *Tjzhelye metally v prirodnyh vodah [Heavy metals in natural waters]*. Moskva: Mir [in Russian].
- Nauchnye obzory sovetskoj literatury po toksichnosti i opasnosti himicheskij veshhestv. Vyp. 69: Kadmij. [Scientific reviews of Soviet literature on toxicity and hazard of chemicals. Issue. 69: Cadmium]*. (1984). Moskva [in Russian].
- Oksijuk, O. P., Zhukinskij, V. N., Braginskij, L. P., Linnik, P. N., Kuz'menko, M. I., & Klenus, V. G. (1993). Kompleksnaja jekologicheskaja klassifikacija kachestva poverhnostnyh vod sushi [Integrated environmental classification of land surface water quality]. *Hydrobiological Journal*, 29(4), 62-76 [in Russian].
- Panin, L. E. (1983). *Biohimicheskie mehanizmy stressa [Biochemical mechanisms of stress]*. Novosibirsk: Nauka [in Russian].
- Patin, S. A., & Morozov, N. N. (1981). *Mikrojelementy v morskij organizmah i jekosistemah [Trace elements in marine organisms and ecosystems]*. Moskva [in Russian].
- Romanenko, V. D. (2004). *Osnovy gidrojekologii [The basics of hydroecology]*. Kyiv: Geneza [in Russian].
- Samali, A., & Cotter, T. G. (1996). Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Experimental Cell Research*, 223(1), 163-170.
- Sanders, B. M., & Martin, L. S. (1993). Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Science of the Total Environment*, 139/140, 459-470.
- Sinjuk, Ju. V., Kurant, V. Z., & Grubinko, V. V. (2003). Vlijanie tjzhelyh metallov na kachestvennyj i kolichestvennyj sostav belkov syvorotki krovi karpa [The influence of heavy metals on the qualitative and quantitative composition of carp serum proteins]. *Gidrobiologicheskij zhurnal*, 39(3), 56-64 [in Russian]

Отримано 29.11.2019