

УДК 594.1(591.044:581.036)

Ю. М. Худіаш, Ю. М. Красюк, О. С. Потрохов,
О. Г. Зіньковський

**ЗМІНИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ У ЗЯБРАХ
БЕЗЗУБКИ (*ANODONTA CUGNEA* L.) ЗА ДІЇ
ПІДВИЩЕНИХ ТЕМПЕРАТУРИ ТА ВМІСТУ ЙОНІВ
НАТРІЮ У ВОДІ¹**

Досліджено особливості біохімічного статусу прісноводного двостулкового молюска *Anodonta cugnea* за дії підвищених температури та концентрації йонів натрію у воді. За дії цих чинників відмічено зниження вмісту глікогену, загального білка та зростання вмісту ліпідів у зябровій тканині молюска. Підвищення активності ферментів лактатдегідрогенази і сукцинатдегідрогенази свідчить про загальну активацію енергетичних процесів у зябрах. Встановлено залежність між активністю АТФ-ази в тканині зябер *A. cugnea* та температурою і вмістом йонів натрію у водному середовищі.

Ключові слова: беззубка, зябра, температура та йонний склад води, активність ферментів, енергетичні субстрати.

Кліматичні зміни та термальне забруднення водних екосистем призводять до зростання температури води, яке, в свою чергу, впливає на інтенсивність росту, розвитку та швидкість метаболічних процесів в організмі гідробіонтів [3, 6, 11, 19]. Поряд з цим у водні об'єкти постійно надходять побутові і промислові стічні води. Це, як правило, змінює йонний склад води, що викликає додаткову негативну дію на біоту. Зокрема, останнім часом спостерігається зростання концентрації йонів натрію у водоймах. Відомо, що Na^+ відіграє важливу роль у підтримці мембранного потенціалу та водного балансу клітини. Перевищення його концентрації у воді часто призводить до порушення нормального функціонування організму і навіть до його загибелі [4, 10].

Об'єктом досліджень було обрано прісноводного двостулкового молюска беззубку звичайну (*Anodonta cugnea*, Linnaeus, 1758). Розповсюдженість цього виду дозволяє використати його в цілях біохімічного моніторингу стану водного середовища. Відомо, що двостулкові молюски мають відносно високу здатність протидіяти негативним чинникам. Вони можуть в несприятливих умовах переходити на анаеробне дихання і на певний час блокувати

¹ Дослідження підтримані Програмою розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень НАН України на 2018 р.

зв'язок з навколишнім середовищем [23]. Отже, вивчення змін біохімічного статусу організму з розвиненими захисними властивостями можуть доповнити відомості щодо адаптаційних можливостей гідробіонтів.

Метою нашої роботи було визначити, на підставі загальних біохімічних показників та активності деяких ферментних систем, фізіологічні реакції беззубки звичайної на дію підвищених температури і концентрації йонів натрію.

Матеріал і методика досліджень. Було проведено декілька серій модельних експериментів у біотехнологічному комплексі Інституту гідробіології НАН України. Матеріалом для досліджень були *A. cygnea*, виловлені у мілководній зоні Київського водосховища (урочище Толокунь) при температурі води $24,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ і концентрації йонів натрію $20,29 \text{ мг/дм}^3$. При цьому зяброву вагітність у особин не спостерігали (місяць — липень).

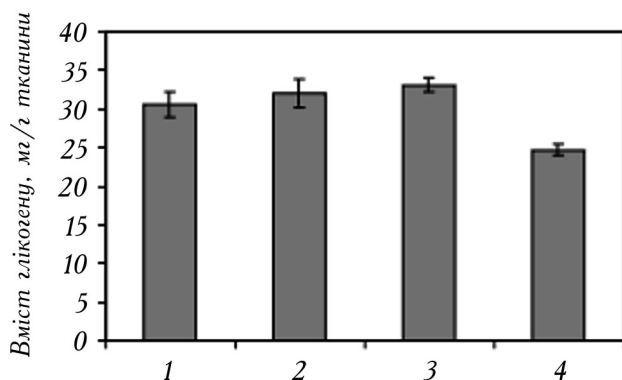
Молюсків (довжина черепашки $86,14 \pm 2,12 \text{ мм}$, висота — $51,57 \pm 1,13 \text{ мм}$) поміщали в акваріуми об'ємом 15 дм^3 по шість особин. У контролі температуру води підтримували на рівні 25°C . У першому дослідному акваріумі температура води становила 30°C , у другому і третьому — відповідно 25 і 30°C , із внесенням солі NaCl у кількості, яка становила 3 ГДК за натрієм (360 мг/дм^3) для водойм рибогосподарського призначення [8].

На 24-ту годину експерименту було відібрано зяброву тканину молюсків для біохімічних досліджень, а саме: активності Na^+ , K^+ АТФ-ази за приростом неорганічного фосфору в середовищі інкубації за методом М. Н. Кондрашової та ін. [1, 12], активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) [13] і сукцинатдегідрогенази (СДГ) [13]. Також визначали вміст загального білка за методом Лоурі [15], вміст загальних ліпідів [26], глікогену [15] та малонного діальдегіду [18]. Отриманий цифровий матеріал оброблено статистично із застосуванням *t*-критерію Стьюдента за допомогою програми Statistica v. 6. [16, 17].

Результати досліджень та їх обговорення

Результати наших досліджень свідчать про те, що чинники зовнішнього середовища в значній мірі впливають на вміст енергетичних субстратів, а також на активність ферментативних систем організму *A. cygnea*. Відомо, що головними енергозапасуючими речовинами в організмі молюсків є глікоген і білки [19, 21]. За нестандартних ситуацій на енергозабезпечення адаптаційних процесів першими використовуються вуглеводи, а саме глюкоза та її полімер глікоген. Таким чином, вміст глікогену у тканинах молюсків є одним з ефективних показників ступеня функціонування регуляторних механізмів енергозабезпечення, зокрема гліколізу [20].

Вміст глікогену в зябровій тканині беззубки у всіх піддослідних групах суттєво відрізнявся. Так, за дії підвищеної температури 30°C і високої концентрації йонів натрію у воді кількість глікогену в зябрах беззубки була вірогідно на 19% нижчою порівняно з контролем (рис. 1).



1. Вміст глікогену в тканині зябер *A. sугnea* за дії температури та сумісної дії температури і підвищеного вмісту натрію у воді. Тут і на рис. 2—7: 1 — контроль; 2 — $T_{\text{води}} = 30^{\circ}\text{C}$; 3 — $T_{\text{води}} = 25^{\circ}\text{C}$ та Na^+ (3 ГДК); 4 — $T_{\text{води}} = 30^{\circ}\text{C}$ та Na^+ (3 ГДК).

Таким чином, підвищена температура і концентрація натрію у воді викликають у зябрах беззубки активацію енергоємних процесів, на забезпечення яких інтенсивно використовується глікоген. Вміст глікогену в зябрах молюсків за дії підвищеної температури 30°C та за оптимальної температури і високої концентрації Na^+ у воді мав тенденцію до збільшення порівняно з контролем.

З фахових літературних джерел відомо, що за недостатньої кількості глікогену молюски можуть також використовувати і білкові субстрати. При цьому в активних процесах енергозабезпечення при спільному споживанні глікогену і білкових субстратів відбувається відновлення рівня глікогену в процесах глюконеогенезу за рахунок збільшення частки використання білка [7, 28, 29]. Дані припущення були підтвержені результатами досліджень вмісту загального білка в зябрах молюсків. Так, його кількість в тканинах *A. sугnea* за сумісної дії підвищеної концентрації йонів натрію та температури 25 і 30°C була вірогідно нижчою (відповідно на 12 і 15%), ніж у молюсків, які знаходились в оптимальних умовах (25°C) (рис. 2). Таким чином, зниження вмісту загального білка і незначне зростання вмісту глікогену в зябрах беззубки за дії температури 30°C і сумісної дії підвищеної концентрації йонів натрію та температури 25°C , очевидно, свідчать про зростання активності процесів енергообміну. В результаті цього відбувається збільшення вмісту глікогену в тканині молюска за рахунок його синтезу з метаболітів білкового катаболізму.

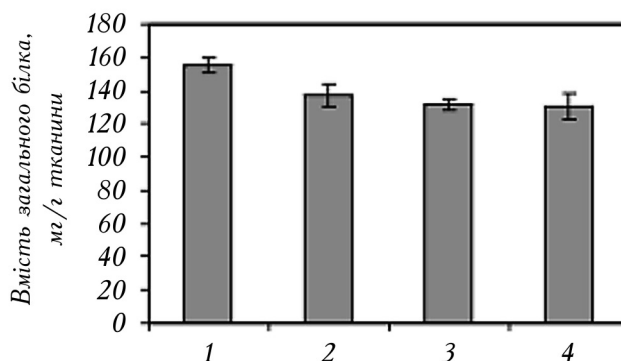
Для більш повної картини енергетичного обміну в організмі молюсків за несприятливої дії зовнішнього середовища нами було досліджено також вміст загальних ліпідів. Ліпіди в організмі молюсків здебільшого використовуються як структурні компоненти мембран клітин. Хоча є відомості, що ліпіди можуть утилізуватися в анаеробних умовах через β -окиснення з утворенням ацетил-КоА [7]. Найчастіше їхнє використання молюсками як енергетичного джерела спостерігається під час зимового росту внаслідок зростання потреб на процеси енергообміну [24].

Наші дослідження не виявили відмінностей вмісту загальних ліпідів у зябрах особин беззубки, що знаходились при температурі води 25°C з високою концентрацією йонів натрію, від контролю (рис. 3).

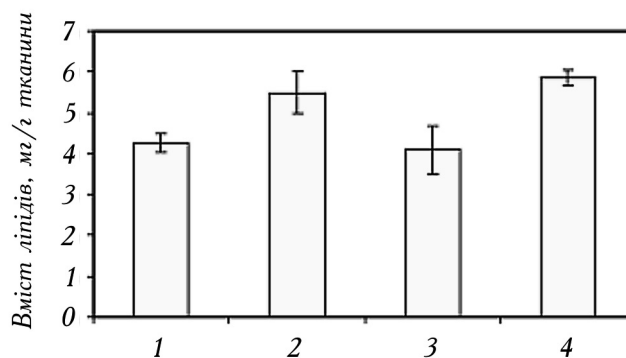
За дії підвищеної температури 30°C та сумісної дії чинників ($T = 30^{\circ}\text{C}$ і 3 ГДК йонів натрію) спостерігалось значне вірогідне зростання вмісту ліпідів у зябровій тканині — на 29 і 38% порівняно з контролем. Це явище, за літературними джерелами, пояснюється тим, що при підсиленні енергетичних процесів за рахунок вуглеводів продукти метаболізму глікогену можуть використовуватись на синтез ліпідів [25, 27].

Одним із головних показників порушення метаболічних процесів за дії різноманітних чинників є зростання інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), одним із кінцевих продуктів якого є малоновий діальдегід (МДА) [2]. Підвищення температури і концентрації натрію у водному середовищі викликає зростання вмісту МДА в зябрах беззубки (рис. 4). Зокрема, за дії високої температури (30°C) та сумісної дії високої концентрації йонів натрію та температури 30°C спостерігалось вірогідне збільшення вмісту продуктів ПОЛ в тканинах м'ясо-кості у 3,5 раза в обох дослідах порівняно з особинами, які знаходились у воді за оптимальних умов (25°C). Отже, підвищення температури, а також концентрації натрію у воді призводить до посилення процесів ПОЛ у тканинах.

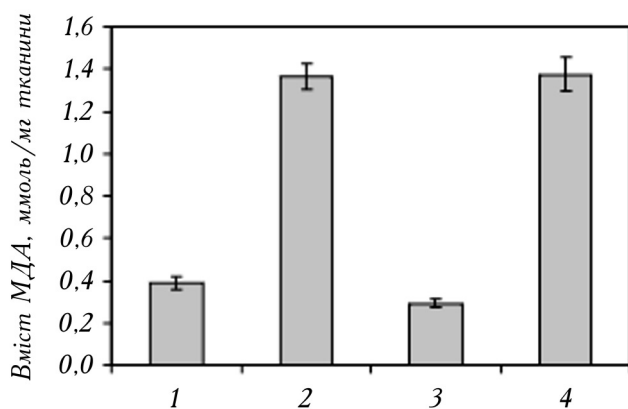
Одним з головних показників енергетичного обміну є активність ЛДГ і СДГ. Останню часто використовують як специфічний маркер, який показово характеризує енергетичний обмін, а також процеси аеробного дихання в тканинах [14]. Активність анаеробного дихання можна охарактеризувати за



2. Вміст загального білка в тканині зябер *A. cygnea* за дії температури та сумісної дії температури і підвищеної концентрації натрію у воді.



3. Вміст загальних ліпідів у тканині зябер *A. cygnea* за дії температури та сумісної дії температури і підвищеної концентрації натрію у воді.



4. Вміст малонового діальдегіду у тканині зябер *A. sугnea* за дії температури та сумісної дії температури і підвищеної концентрації натрію у воді.

ГДК). При цьому активність СДГ у тканині зябер була вірогідно на 43% вищою, ніж у контролі з температурою води 25°C (рис. 5). Очевидно, за таких умов висока активність СДГ в зябрах беззубки свідчить про значне підвищення активності енергетичних обмінних процесів під час перебування організму у стресовому стані.

Дослідження також засвідчили активність ЛДГ у зябрах беззубки в дослідних групах порівняно до контролю. Так, у зябрах молюсків за дії температури води 30°C активність ЛДГ була вірогідно вищою на 26%, а за дії високої концентрації Na^+ при температурі 25 і 30°C – відповідно на 12 і 40%, порівняно з контрольними особинами (рис. 6).

Таким чином, у особин *A. sугnea* за дії температури 30°C та при сумісному впливі температури 25°C та йонів Na^+ (3 ГДК) спрацював компенсаторний механізм регуляції енергетичних процесів. Оскільки на тлі відсутності певних змін активності СДГ в їхніх тканинах спостерігається зростання активності ЛДГ, це свідчить про зростання питомої частки анаеробних процесів. Як правило, анаеробні процеси характеризуються значно нижчими енерговитратами порівняно з аеробними [29].

У молюсків, які знаходились під сумісним впливом чинників ($T = 30^\circ\text{C}$ і 3 ГДК йонів натрію), зафіксовано зростання активності обох ферментів (СДГ, ЛДГ), що, вірогідно, свідчить про загальну активацію енергообмінних процесів у зябровій тканині.

З фахових літературних джерел відомо, що у більшості випадків значне зростання активності процесів анаеробного дихання призводить до пригнічення активності аеробних процесів. Зниження активності ферменту СДГ відбувається за участю продуктів метаболізму анаеробного дихання, а

активністю лактат-дегідрогенази. Зростання цього показника є свідченням переходу метаболізму з ефективного аеробного на менш ефективний анаеробний шлях, що є компенсаторним механізмом генерування енергії в умовах гіпоксії [22].

Результати наших досліджень вказують на значне підвищення активності СДГ у молюсків за сумісної дії високої температури (30°C) і підвищеної концентрації Na^+ (3

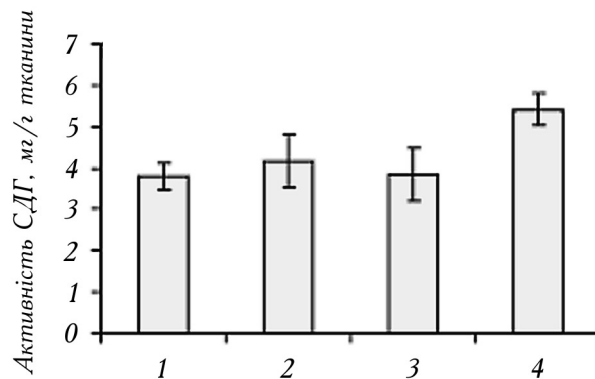
само малонату. За високої інтенсивності аеробних процесів інгібування ускладнюється через високий вміст сукцинату (субстрат СДГ), який є більш активним, ніж малонат [5, 9].

Відсутність очікуваного зниження активності СДГ у зябрах беззубок, які знаходились у воді з підвищеною температурою (30°C), пояснюється частковим анаеробіозом (див. рис. 5). Відомо, що в момент переходу на анаеробний метаболізм в початковий період гіпоксії можливий одночасний перебіг аеробних і анаеробних метаболічних процесів [22, 29].

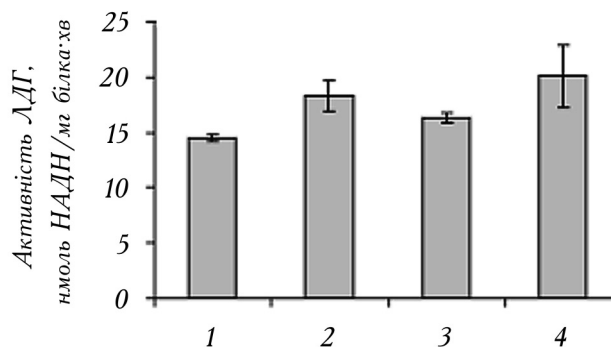
Таким чином, висока активність СДГ і ЛДГ спричиняє активацію енергетичних обмінних процесів. Як уже відмічалось вище, активність метаболічних процесів в організмі молюсків безпосередньо залежить від температурного чинника, оскільки вони належать до холоднокровних тварин. Це підтвердилось при визначенні активності АТФ-ази, яка в тканині зябер беззубки при температурі води 30°C була вірогідно на 28% вищою, ніж у контрольних особин (25°C) (рис. 7).

Слід відмітити, що активність АТФ-ази залежить як від впливу температурного чинника, так і від йонного складу водного середовища. Зокрема, при високій концентрації йонів натрію (3 ГДК) у воді та температурі 25°C та 30°C активність АТФ-ази у тканині зябер беззубки була вірогідно відповідно на 51 і 39% вищою порівняно з контролем (див. рис. 7). Така залежність пояснюється вагомою участю цього ферменту у регулюванні йонного обміну в організмі.

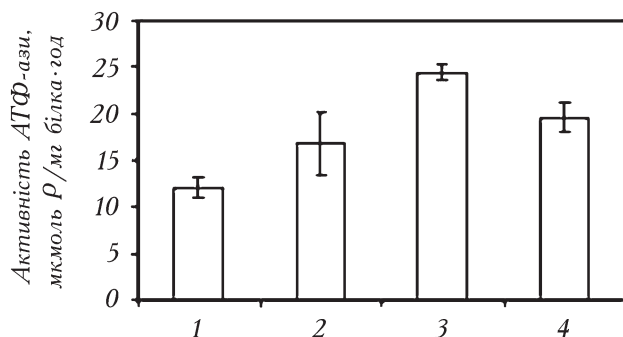
Як відомо, натрій відіграє важливу роль у внутрішньоклітинному і міжклітинному обміні. Від вмісту натрію у клітині залежить осмотичний тиск



5. Активність СДГ у тканині зябер *A. sугnea* за дії температури та сумісної дії температури і підвищеної концентрації натрію у воді.



6. Активність ЛДГ у тканинах зябер молюсків за дії температури та сумісної дії температури і підвищеної концентрації натрію у воді.



7. Активність АТФ-ази в тканині зябер *A. cygnea* за дії температури та сумісної дії температури і підвищеної концентрації натрію у воді.

Активність ферменту у зябрах беззубки була на 20% нижчою, ніж особин, які знаходились у воді з таким же температурним режимом і де концентрація Na^+ не перевищувала ГДК.

Очевидно, значне підвищення температури і концентрації натрію викликало певні порушення регуляторних процесів в організмі молюска, а саме йонного обміну внаслідок зниження активності АТФ-ази.

Заключення

Підсумовуючи результати досліджень, можемо дійти висновку, що температура 30°C і висока концентрація натрію у воді (360 мг/дм^3) викликають значні зміни метаболічних процесів у двостулкового молюска беззубки.

Підвищена температура і концентрація йонів натрію у воді спричинили різке зростання інтенсивності енергообмінних процесів, про що свідчать значне зниження вмісту енергетичних субстратів і висока активність ЛДГ і СДГ у зябровій тканині молюсків.

При підвищенні температури, а також концентрації натрію у воді у зябрах *Anodonta cygnea* збільшується вміст МДА, що вказує на зміни у ліпідному обміні та зростання пулу ліпідів у тканинах.

Негативні зміни в активності АТФ-ази можуть призвести до порушень йонного обміну в організмі, а в подальшому — до його загибелі.

Досліджувані біохімічні показники можна використовувати як індикатори фізіологічного стану беззубки, яка мешкає у різних умовах середовища, та для характеристики стану її природних популяцій.

**

і об'єм рідини в ній. Очевидно, висока активність АТФ-ази в зябрах молюсків, які знаходились у воді з високою концентрацією натрію, зумовлена виведенням його надлишкового вмісту з клітини для забезпечення (збереження) тканинного гомеостазу.

За сумісного впливу температури 30°C та концентрації йонів натрію 360 мг/дм^3 ак-

*Исследованы особенности биохимического статуса пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* при действии повышенной температуры и концентрации ионов натрия в воде. Под влиянием этих факторов отмечено снижение содержания гликогена, общего белка и возрастание содержания липидов в жаберной ткани моллюска. Повышение активности ферментов ЛДГ и СДГ свидетельствует об общей интенсификации энергетических процессов в жабрах. Установлена зависимость между активностью АТФ-азы в ткани *A. cygnea* и температурой и содержанием ионов натрия в водной среде.*

**

*The features of the biochemical status of freshwater bivalve mollusk *Anodonta cygnea* at the elevated temperature and the concentration of sodium ions in the water. By the action of these factors marked reduction of glycogen, total protein and lipid growth in the gill tissue of the mollusk. Increased LDH enzyme activity and SDG shows the total activation energy processes in the gills. The presence of relationship between ATPase activity in the tissue *A. cygnea* and temperature and content of sodium ions in water.*

**

1. Асатиани В.С. Ферментативные методы анализа. — М.: Наука, 1969. — 740 с.
2. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление и радиация. — Киев: Наук. думка, 1991. — 256 с.
3. Бейтс Б.К. Кундцевич З.В., Плотникова Ж.П. Изменение климата и водные ресурсы. Технический документ Межправительственной группы экспертов по изменению климата. Секретариат МГИЭК. — Женева, 2008. — 228 с.
4. Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. — М.: Наука, 2000. — 216 с.
5. Вороніна Л.М. Біологічна хімія. — Харків: Основа, 2000. — 608 с.
6. Гопченко Е.Д., Лобода Н.С. Оценка возможных изменений водных ресурсов Украины в условиях глобального потепления // Гидробиол. журн. — 2000. — Т. 36, № 3. — С. 67—77.
7. Горомосова С. А., Шапиро А. З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. — 120 с.
8. *Гранично допустимі значення показників якості води для рибогосподарських водойм. Загальний перелік ГДК і ОБРВ шкідливих речовин для води рибогосподарських водойм : [№ 12-04-11 чинний від 09.08.1990].* — К: Міністерство рибного господарства СРСР, 1990. — 45 с.
9. Свтушенко М.Ю. Екологічна фізіологія та біохімія гідробіонтів. Методичний посібник для підготовки магістрів за спеціальністю 8.130301 — «Водні біоресурси». — К.: НУБіП, 2015. — С. 118.
10. Иваненко Л.Д., Стадниченко А.П., Выскушенко Д.А. Влияние хлоридов натрия и калия на быстрые поведенческие и физиологические реакции прудовика (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) при заражении партенитами трематоды // Паразитология. — 1999. — № 4. — С. 335—339.

11. *Клімат Києва* / Під ред. В.І. Осадчого, В.М. Бабіченко. — К.: Ніка-центр, 2010. — 320 с.
12. Кондрашова М.Н., Лесогорова М.Н., Шноль С.Э. Метод определения неорганического фосфора по спектрам поглощения в ультрафиолете // Биохимия. — 1965. — Т. 30, вып. 3. — С. 567—572.
13. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)*. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 272 с.
14. Миронюк М.О., Арсан О.М., Хоменчук В.О. Вплив сирії нафти і дизпалива на активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази в організмі коропа (*Syrpinus carpio* L.) // Гидробиол. журн. — 2011. — Т. 47, № 2. — С. 112—118.
15. *Практикум по биохимии* / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 510 с.
16. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов. — Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1961. — 220 с.
17. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1975. — 295 с.
18. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 66—68.
19. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — 568 с.
20. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические исследования гидробионтов // Экология моря. — 1996. — Вып. 45. — С. 38—45.
21. Шульман Г.Е., Аболмасова Г.И., Столбов А.Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи совр. биологии. — 1993. — Т.113, вып. 5. — С. 576—586.
22. Bayne B.L., Livingstone D.R. Responses of *Mytilus edulis* L. to low oxygen tension: acclimation of the rate of oxygen consumption // J. Comp. Physiol. — 1977. — Vol. 114. — P. 29—142.
23. Burnett L.E., Stickle W.B. Physiological responses to hypoxia // Coastal hypoxia: consequences for living resources and ecosystems / Ed. by N.N. Rabalais, R.E. Turner, 2001. — Vol. 58, Chap. 6. — P. 101—114. (Coastal and estuarine studies).
24. De La Parra A.M., Garcia O., San Juan F. Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) in relation to the gametogenic cycle // Journal of Shellfish Research. — 2005. — Vol. 24, N 2. — P. 457—467.
25. Fokina N., Nemova N., Nefedova Z. Fatty acid composition of mussels *Mytilus edulis* under short-term anoxia // Chemistry and physics of lipids. Abstracts from 48th Intern. conf. on the bioscience of lipids (Turku, Finland, 4—8 sept. 2007). — Turku, 2007. — Vol. 149, Suppl. — P. 60.
26. Knight J.A., Anderson S., Rawle J.M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids // Clinical Chemistry. — 1972. — Vol. 18, N 3. — P. 199—202.

27. Michaelidis B., Pallidou A., Vakouftsi P. Effects of anoxia on the extra- and intracellular acid-base status in the land snail *Helix lucorum* (L.): lack of evidence for a relationship between pyruvate kinase down-regulation and acid-base status // J. Exp. Biol. — 1999. — Vol. 202, N 12. — P. 1667—1675.
28. de Zwaan A., Mathien A. Cellular energy metabolism in the Mytilidae: an overview. // The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture / Ed. by E. Gosling. — Amsterdam: Elsevier, 1992. — P. 223—307.
29. de Zwaan A., Wijsman A. Anaerobic metabolism in Bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism // Comp. Biochem. Physiol. Part B. — 1976. — Vol. 54, N 3. — P. 313—324.

Інститут гідробіології НАН України, Київ

Надійшла 23.03.18