



# БІЯЛОГІЯ

УДК 594.38:591.128.3:591.044

## Действие гипертермии разной продолжительности на модельные тест-организмы

**А.П. Голубев\***, **А.М. Хомич\***, **В.В. Долматова\*\***, **Т.А. Толкачева\*\***

*\*Международный государственный экологический университет  
имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета*

*\*\*Учреждение образования «Витебский государственный университет  
имени П.М. Машерова»*

*Будучи эктотермами, моллюски (*Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*) дают объективную методическую возможность оценить влияние температурного фактора на состояние системы антиокислительной защиты в их тканях.*

*Цель исследования – выявление особенностей метаболизма у двух близкородственных видов пресноводных брюхоногих моллюсков, отличающихся по типу транспорта кислорода при действии гипертермии разной продолжительности.*

**Материал и методы.** *Эксперимент проведен на пресноводных легочных моллюсках двух видов (*Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*). Для создания условий гипертермии особи выдерживались в термостате при температуре 35°C от 1 часа до 16 часов. Контролем служили моллюски, содержащиеся в отстоянной водопроводной воде при комнатной температуре. В гомогенате гепатопанкреаса и гемолимфе определяли ТБК-активные продукты, концентрацию мочевины, мочевой кислоты и глюкозы.*

**Результаты и их обсуждение.** *В условиях антропогенно индуцированной температурной нагрузки происходит нарушение метаболизма в тканях пресноводных легочных моллюсков. Полученные результаты свидетельствуют о причинно-следственной связи между временем действия гипертермии и ответной реакцией у прудовиков и катушек. Установлено, что у двух видов в разные сроки начинают проявляться биохимические адаптации к условиям гипертермии в виде повышения уровня мочевой кислоты, мочевины, ТБК-позитивных продуктов и понижения концентрации глюкозы в гемолимфе.*

**Заключение.** *Выявлено, что биохимическими маркерами теплового стресса являются концентрации мочевины, мочевой кислоты, глюкозы и ТБК-позитивных веществ. Длительная гипертермия продолжительностью 16 часов вызывает статистически значимые изменения всех вышеперечисленных показателей у обоих видов пресноводных брюхоногих моллюсков.*

**Ключевые слова:** *гипертермия, перекисное окисление липидов, мочевина, мочевая кислота, ТБК-активные продукты, глюкоза.*

## Impact of Hyperthermia of Different Duration on Model Test Organisms

A.P. Golubev\*, A.M. Khomich\*, V.V. Dolmatova\*\*, T.A. Tolkacheva\*\*

\*A.D. Sakharov International State Ecological University of Belarusian State University

\*\*Educational Establishment «Vitebsk State P.M. Masherov University»

*Being ectotherms, mollusks (*Lymnaea stagnalis* and *Planorbium corneum*) provide an objective methodological opportunity to assess the influence of the temperature factor on the state of the antioxidant defense system in their tissues.*

*The aim of the study was to reveal the metabolic peculiarities of two closely related species of freshwater gastropods that differ in the type of oxygen transport under the action of hyperthermia of different duration.*

**Material and methods.** *The experiment was carried out on freshwater pulmonary mollusks of two species (*Lymnaea stagnalis* and *Planorbium corneum*). To create conditions for hyperthermia, the individuals were kept in a thermostat at 35°C from 1 to 16 hours. The control was the mollusks contained in standing tap water at room temperature. In the homogenate of hepatopancreas and hemolymph, TBA-active products, the concentration of urea, uric acid and glucose were identified.*

**Findings and their discussion.** *Under conditions of anthropogenically induced temperature loading, metabolic disturbances occur in the tissues of freshwater pulmonary mollusks. The results obtained indicate a causal relationship between the time of action of hyperthermia and the response in the pond sniffer and coils. It was established that biochemical adaptations to hyperthermia conditions in the form of an increase in the level of uric acid, urea, TBA-positive products and a decrease in the concentration of glucose in the hemolymph begin to appear in two species at different times.*

**Conclusion.** *It was revealed that biochemical markers of heat stress are the concentrations of urea, uric acid, glucose and TBA-positive substances. Prolonged 16 hour hyperthermia lasting causes a change in all of the above indices in both species of freshwater gastropod mollusks.*

**Key words:** *hyperthermia, lipid peroxidation, urea, uric acid, TBA-active products, glucose.*

Проблема глобальных климатических изменений – одна из наиболее актуальных угроз, стоящих перед большинством экосистем планеты. Температура является важнейшим экологическим фактором среды, от которого напрямую зависят обмен веществ и развитие гидробионтов. По сравнению с почвой и воздухом вода отличается более высокой термостабильностью, что более благоприятно для живых организмов. Глобальное потепление отражается на состоянии водных и наибольшей степени пресноводных сообществ. Изменение температурного режима водоема приводит к смене ключевых параметров среды обитания, таких как газовый режим и растворимость веществ, в том числе и токсичных компонентов, поступающих в водоем с грунтовыми и сточными водами. Повышенная температура может усилить негативное влияние различных компонентов, в том числе и ксенобиотиков, на организмы, населяющие водные экосистемы [1]. Кислород играет ключевую роль в энергообеспечении клеток, а гипоксия является важным фактором нарушения функционирования и повреждения клеток и органов. Гипоксическому состоянию часто сопутствует повышение температуры тела [2].

Повышение температуры приводит к ряду структурно-функциональных перестроек клеточных мембран, что сопровождается накоплением продуктов перекисного окисления липидов. Повреждение мембран в свою очередь влияет на состояние энергетического обмена организмов. Так при нарушении структуры мембран обеспечение работы электрон-транспортной цепи митохондрий становится невозможно, что приводит к переключению на анаэробный гликолиз [3].

В современных программах экологического мониторинга большое внимание уделяется молекулярным биомаркерам – биохимическим показателям состояния организмов в природных экосистемах, особенно гидробионтов [4]. Будучи эктотермами, т.е. животными, температура тела которых соответствует температуре окружающей среды, моллюски дают объективную методическую возможность оценить влияние температурного фактора на состояние системы антиокислительной защиты в тканях [5].

В большинстве случаев не представляется возможным проследить всю совокупность биохимических реакций, закономерно развивающихся в биологической системе в ответ на действие повреждающего фактора. Однако имеются узловые биохимические системы, повреждения которых можно рассматривать как наиболее чувствительные индикаторы развития деструктивных процессов в организме животных. Широко используемыми индикаторами развития окислительного стресса являются изменение активности антиоксидантных ферментов, изменение концентрации низкомолекулярных антиоксидантов и накопление продуктов перекисного окисления липидов [6].

Недостаточно изученным остается вопрос метаболических изменений у моллюсков в условиях отклонения оптимальной температуры среды в сторону гипертермии.

Цель исследования – выявление особенностей метаболизма у двух близкородственных видов пресноводных брюхоногих моллюсков, отличающихся по типу транспорта кислорода при действии гипертермии разной продолжительности.

**Материал и методы.** В работе использованы два представителя легочных моллюсков – большой прудовик (*Lymnaea stagnalis* L.) и катушка роговая (*Planorbis cornutus* L.). Моллюсков собирали вручную из р. Витьба, затем подвергли 15-суточной акклиматизации: объем аквариумов с отстоянной водопроводной водой 100 л, плотность посадки 3 экземпляра на литр, температура воды – 20–22°C, pH 7,2–7,7. Ежедневно осуществляли замену 1/3 воды. Животных кормили свежими листьями одуванчика или зеленого салата. Содержание в лаборатории не было стрессовым, т.к. гибель моллюсков в это время не отмечали. Для создания условий гипертермии особи выдерживались в термостате при температуре 35°C от 1 часа до 16 часов. Контролем служили моллюски, содержащиеся в отстоянной водопроводной воде при комнатной температуре. Для оценки влияния повышенной температуры среды на терморезистентность в ходе исследования определяли содержание ТБК-активных продуктов в гепатопанкреасе, концентрацию мочевой кислоты, мочевины и глюкозы в гемолимфе моллюсков. Мочевину, мочевую кислоту и глюкозу выявляли в гемолимфе (у катушек с предварительным депротеинированием) с помощью биохимических наборов «Анализ X», а МДА в гомогенате гепатопанкреаса по Uchiyama [7] рассчитывали, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , и выражали в мкмольях на 1 г сырой ткани. Обработку полученных данных проводили методами математической статистики для малых выборок. Относительное содержание ТБК-активных продуктов и активность ферментов выражали в виде  $M \pm m$ , достоверность различий между группами оценивали при  $p \leq 0,05$  с помощью t-критерия Стьюдента, после проверки гипотез о нормальности распределения.

**Результаты и их обсуждение.** В норме антиоксидантной защиты клеток достаточно для локальной детоксикации активных форм кислорода (АФК) и для предотвращения их диффузии в клетке. При действии неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как повышенная температура, скорость образования, АФК может повышаться и изменять направление метаболических потоков, что приводит к развитию состояния окислительного стресса.

Ранее авторами было установлено действие гипо- и гипертермии на модельный тест-объект растительного происхождения (*Hordeum vulgare* L.). Выявлено, что под влиянием высокотемпературного стресса в листьях ячменя так же, как и при действии низкой температуры, достоверно увеличивается активность антиоксидантных ферментов на 6,6% (глутатионредуктаза), на 57,7% (каталаза) и усиливается накопление ТБК-реактивных продуктов на 68,0%. Применением биологически активных композиций (оксидат торфа и водного экстракта куколок дубового шелкопряда) этот эффект нивелируется [8].

Известно, что у брюхоногих моллюсков, которые представляют собой удобные модельные тест-системы, компонентами антиоксидантной системы являются аммиак, мочевина, мочевая кислота, пурины и аминокислоты. У аммонителлических гидробионтов, в том числе у пресноводных брюхоногих моллюсков, на долю мочевой кислоты в функционировании антиоксидантной системы приходится 56%, а на долю мочевины 22%. Брюхоногие моллюски не способны синтезировать мочевину посредством орнитинового цикла и образуют ее только из экзогенного орнитина, поступающего с пищей. Большая часть продуктов их азотистого обмена диффундирует в водную среду через кожные покровы, остальное выделяется с мочой [9]. На долю глюкозы приходится более 85% сахаров, содержащихся в гемолимфе, поэтому она является одной из наиболее чувствительных систем организма и может быть информативной при воздействии температурного фактора. В качестве биохимических маркеров в гемолимфе моллюсков определили концентрацию мочевины, мочевой кислоты и глюкозы, а в гепатопанкреасе – показателя перекисного окисления липидов – малонового диальдегида.

При изучении последствий повышения температуры окружающей среды от 1 часа до 16 часов для двух видов моллюсков получены результаты, приведенные в табл. 1–2. Из табл. 1 видно, что содержание мочевины в гемолимфе прудовиков после теплового воздействия достоверно увеличивается на 21% через 4 часа и продолжает расти до 48% по сравнению с контролем через 16 часов. Содержание мочевой кислоты в гемолимфе незначительно увеличивается при действии теплового стресса в течение 8 часов. При более длительном действии этот показатель статистически значимо увеличивается на 8–25% по сравнению с контрольной группой.

Концентрация ТБК-положительных веществ (малонового диальдегида – МДА) в гепатопанкреасе постепенно достоверно увеличивается от 24% (8 часов гипертермии) до 123% (16 часов гипертермии). Концентрация глюкозы достоверно уменьшается от 16% спустя 4 часа теплового воздействия до 54% спустя 16 часов по сравнению с контрольными прудовиками.

Таблица 1

**Влияние гипертермии разной продолжительности на некоторые биохимические показатели гемолимфы и гепатопанкреаса *L. stagnalis*, M±m**

Показатели		Мочевина, ммоль/л	Мочевая кислота, ммоль/л	МДА, мкмоль/г	Глюкоза, ммоль/л
Контроль		13,66±0,48	75,47±1,52	2,01±0,13	3,74±0,12
Время действия температуры, ч	1	13,95±0,71	77,81±1,28	2,28±0,11	3,42±0,14
	4	16,66±0,35*	78,58±1,45	2,37±0,14	3,15±0,13*
	8	17,12±0,24*	80,23±2,01	2,49±0,1*	2,15±0,13*
	10	18,52±0,41*	81,45±0,75*	2,82±0,08*	2,05±0,06*
	12	19,41±0,32*	83,29±1,14*	2,99±0,19*	1,94±0,05*
	16	21,02±0,46*	94,36±3,01*	4,49±0,24*	1,73±0,04*

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Согласно данным, приведенным в табл. 2, содержание мочевины в гемолимфе катушек увеличивается до 22% по сравнению с контролем при максимальной продолжительности теплового воздействия. Концентрация мочевой кислоты в гемолимфе катушек статистически значимо увеличивается от 11% (1 час теплового воздействия) до 36% (16 часов теплового воздействия). Содержание ТБК-положительных веществ в гепатопанкреасе катушек с течением времени постепенно увеличивается и достигает отличия от контроля 59%. Концентрация глюкозы в гемолимфе катушек достоверно снижается от 31% (4-часовая гипертермия) до 52% (16-часовая гипертермия) по сравнению с контролем.

Таблица 2

**Влияние гипертермии разной продолжительности на некоторые биохимические показатели гемолимфы и гепатопанкреаса *P. corneus*, M±m**

Показатели		Мочевина, ммоль/л	Мочевая кислота, ммоль/л	МДА, мкмоль/г	Глюкоза, ммоль/л
Контроль		13,99±0,16	125,62± 2,02	2,53±0,10	3,67±0,12
Время действия температуры, ч	1	14,04±0,46	139,12±3,41*	2,59±0,11	3,34±0,23
	4	14,69±0,17	164,85±3,05*	2,61±0,09	2,50±0,07*
	8	15,41±0,31*	165,75±1,82*	2,65±0,10	2,33±0,08*
	10	15,86±0,28*	167,25±2,02*	2,96±0,16	2,20±0,04*
	12	16,49±0,23*	169,14±1,04*	3,07±0,14*	2,06±0,06*
	16	17,07±0,18*	171,17±1,54*	4,02±0,18*	1,75±0,03*

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Как следует из представленных результатов, изменения биохимических показателей белкового и углеводного обменов происходят при больших отклонениях температуры среды от оптимальных значений. Увеличение концентрации низкомолекулярных антиоксидантов мочевины и мочевой кислоты свидетельствует

об активизации противокислительной системы. Повышение концентрации ТБК-реагирующих веществ (МДА) связано с развитием процесса перекисного окисления липидов. Снижение содержания глюкозы при индуцированной гипертермии указывает на повышение интенсивности метаболизма и возрастающее расходование энергии. Таким образом, изменения приведенных показателей стали отражением развития прооксидантных процессов, протекающих в условиях температурного стресса.

Несмотря на видовую специфичность и физиологические особенности установлена близкая закономерность изменения направления метаболических потоков при действии повышенной температуры в течение 16 часов (рис.).

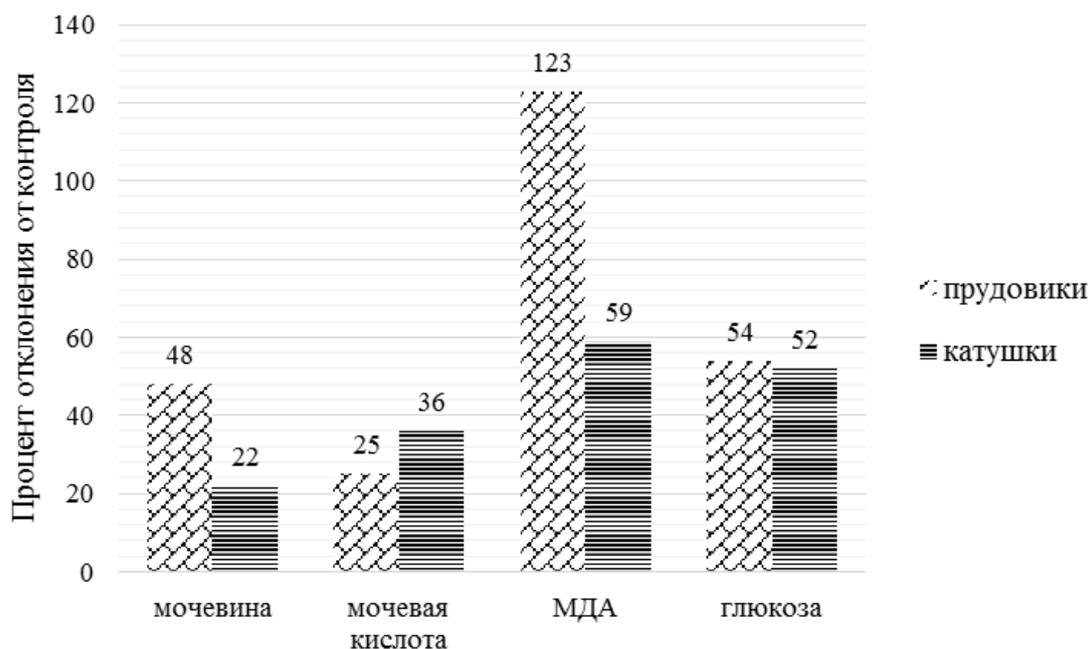


Рис. Сравнение процентов отклонения биохимических показателей группы моллюсков при действии 16-часовой гипертермии от контрольной группы.

Для анализа время появления статистически значимых отклонений биохимических показателей от контроля составлена таблица 3.

Таблица 3

Период времени включения компенсаторных механизмов противодействия гипертермии

Объект	Показатели			
	Мочевина	Мочевая кислота	МДА	Глюкоза
<i>L. stagnalis</i>	4 часа	10 часов	8 часов	4 часа
<i>P. corneus</i>	8 часов	1 час	12 часов	4 часа

Из табл. 3 видно, что тепловой стресс, действующий в течение 1 часа, вызывает только увеличение концентрации мочевой кислоты у прудовиков. При увеличении теплового воздействия до 4-х часов происходят накопление мочевины в гемолимфе прудовиков и уменьшение концентрации глюкозы у двух видов моллюсков. Гипертермия длительностью 8 часов приводит к накоплению МДА у прудовиков и мочевины у катушек. Содержание моллюсков в условиях повышенной температуры в течение 10 часов вызывает увеличение содержания мочевой кислоты у прудовиков, а 16 часов – содержания МДА у катушек. Длительная гипертермия продолжительностью 16 часов способствует статистически значимым изменениям всех вышеперечисленных показателей у обоих видов пресноводных брюхоногих моллюсков. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о причинно-следственной связи между временем действия гипертермии и ответной реакцией у прудовиков и катушек.

**Заключение.** В условиях антропогенно индуцированной температурной нагрузки происходит нарушение метаболизма в тканях пресноводных легочных моллюсков. Экспозиция гидробионтов в условия повышенной температуры приводит к нарушению прооксидант-антиоксидантного баланса и, следовательно, к развитию окислительного стресса. Приспособление гидробионтов к изменению температурных условий идет за счет биохимических и физиологических адаптивных реакций и отличается у двух близкородственных видов. Отмечена более выраженная устойчивость катушек по сравнению с прудовиками, что, вероятно, связано с ранним реагированием на тепловое воздействие повышением уровня эндогенного антиоксиданта мочевой кислоты. При этом процесс перекисного окисления липидов притормаживается, о чем свидетельствует увеличение концентрации МДА только через 12 часов теплового воздействия. Наоборот, концентрация мочевины у прудовиков повышается при 4-часовой гипертермии, а у катушек – при 8-часовой. Одинаково отреагировали на температурный стресс продолжительностью 4 часа оба вида моллюсков снижением концентрации глюкозы. Выявлено, что биохимическими маркерами теплового стресса являются концентрации мочевины, мочевой кислоты, глюкозы и ТБК-позитивных веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Верещагина, К.П. Особенности активации неспецифических механизмов стресс-резистентности у байкальского эндемичного вида амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) в условиях постепенного температурного стресса / К.П. Верещагина [и др.] // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2014. – № 4. – С. 131–138.
2. Лобанова, Е.М. Влияние сочетанного действия гипоксии и гипертермии на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов / Е.М. Лобанова // Сборник научных работ «Труды молодых ученых». – Минск, 2004. – С. 77–80.
3. Верещагина, К.П. Активность ферментов антиоксидантной защиты и анаэробного гликолиза в условиях температурного градиента у палеарктического *Lymnaea stagnalis* / К.П. Верещагина [и др.] // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2013. – № 4. – С. 340–345.
4. Лукьянова, О.Н. Молекулярные биомаркеры в экологическом мониторинге морских экосистем / О.Н. Лукьянова // Известия ТИНРО. – 2003. – Т. 133. – С. 271–281.
5. Сидоров, А.В. Состояние антиокислительной защиты в центральных нервных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* при различных температурах окружающей среды / А.В. Сидоров, Г.Т. Маслова // Новости медико-биологических наук. – 2008. – № 1–2. – С. 74–78.
6. Довженко, Н.В. Использование биохимических маркеров в активном мониторинге загрязнения морской среды / Н.В. Довженко [и др.] // Вестник СПбГУ. – 2012. – № 3. – С. 12–24.
7. Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // Analit. Biochem. – 1987. – Vol. 86. – P. 271–278.
8. Толкачева, Т.А. Применение биологически активных композиций у *Hordeum vulgare* L. при кратковременной гипо- и гипертермии / Т.А. Толкачева // Защита растений: сб. науч. тр. / РУП Ин-т защиты растений; гл. ред. Л.И. Трешко. – Несвиж, 2013. – Вып. 37. – С. 276–282.
9. Стадниченко, А.П. Влияние нитрата аммония на содержание остаточного азота в гемолимфе катушки пурпурной (*Mollusca: Pulmonata: Bulinidae*) в норме и при инвазии трематодами / А.П. Стадниченко, Г.Е. Киричук // Паразитология. – 2000. – № 5. – С. 402–407.

## REFERENCE

1. Vereshchagina, K.P. Peculiarities of activation of nonspecific mechanisms of stress-resistance in the Baikal endemic species of amphipods *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) under conditions of gradual temperature stress / K.P. Vereshchagina [and others] // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2014. – No. 4. – P. 131–138.
2. Lobanova, E.M. Influence of the combined effect of hypoxia and hyperthermia on the phagocytic activity of alveolar macrophages / E.M. Lobanova // Collection of scientific works «Proceedings of Young Scientists». – Minsk, 2004. – P. 77–80.
3. Vereshchagina, K.P. The activity of antioxidant protection enzymes and anaerobic glycolysis under conditions of a temperature gradient in the Palearctic *Lymnaea stagnalis* / K.P. Vereshchagina [and others] // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2013. – No. 4. – P. 340–345.
4. Lukyanova, O.N. Molecular Biomarkers in Ecological Monitoring of Marine Ecosystems / O.N. Lukyanova // News of TINRO. – 2003. – T. 133. – P. 271–281.
5. Sidorov, A.V. The state of antioxidant protection in the central nervous ganglia of the *Lymnaea stagnalis* mollusk at various ambient temperatures / A.V. Sidorov, G.T. Maslova // News of biomedical sciences. – 2008. – No 1–2. – P. 74–78.
6. Dovzhenko, N.V. Use of biochemical markers in active monitoring of marine pollution / N.V. Dovzhenko [and others] // Bulletin of St. Petersburg State University. – 2012. – No. 3. – P. 12–24.
7. Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // Analit. Biochem. – 1987. – Vol. 86. – P. 271–278.
8. Tolkacheva, T.A. The use of biologically active compositions in *Hordeum vulgare* L. with short-term hypo- and hyperthermia / T.A. Tolkacheva // Plant Protection: Sat. sci. / Institute of Plant Protection; Ch. Ed. L.I. Trepashko. – Nesvizh, 2013. – Iss. 37. – P. 276–282.
9. Stadnichenko, A.P. Influence of ammonium nitrate on the content of residual nitrogen in the haemolymph of the magenta coil (*Mollusca: Pulmonata: Bulinidae*) in norm and with trematode infestation / A.P. Stadnichenko, G.E. Kirichuk // Parasitology. – 2000. – No. 5. – P. 402–407.

Поступила в редакцию 22.09.2017

Адрес для корреспонденции: e-mail: tanyatolkacheva@mail.ru – Толкачева Т.А.