



УДК 556.5:556.114:001.891

COMPARATIVE BIOCHEMICAL ANALYSIS OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSCS TISSUES IN THE LAKES OF VITEBSK AND GOMEL AREAS OF THE REPUBLIC BELARUS**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ, ОБИТАЮЩИХ В ОЗЕРАХ ВИТЕБСКОЙ И ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТЕЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ****Chirkin A.A./Чиркин А.А.***d.b.s., prof./д.б.н., проф.***Balaeva-Tikhomirova O.M./Балаева-Тихомирова О.М.***c.b.s., as. prof./к.б.н., доц.***Danchenko E.O./Данченко Е.О.***d.m.s., prof./д.м.н., проф.***Tolkacheva T.A. /Толкачева Т.А.***c.b.s., as. prof./к.б.н., доц.***Katcelson E.I./Кацнельсон Е.И.***postgrad. st./аспирант**Vitebsk State University named after P.M. Masherova, Vitebsk, Belarus**Витебский государственный университет имени П.М. Машерова, Витебск, Беларусь*

Аннотация. В статье описан способ экологического анализа водоемов на основе использования биохимических методов исследования тканей двух видов легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода. Установлено, что в водоеме Гомельской области у легочных пресноводных моллюсков наблюдается более интенсивный распад нуклеиновых кислот (повышение содержания мочевой кислоты), вероятно, за счет процессов окислительного стресса (повышение уровня МДА, снижение содержания восстановленного глутатиона и активности каталазы при относительном истощении запасов гликогена). Наряду с признанным модельным организмом для оценки гидробиологического статуса водной среды обитания *Lymnaea stagnalis* целесообразно оценивать также биохимические процессы адаптационного плана в тканях *Planorbarius corneus*. Предлагаемый способ расширяет возможности биоиндикации водоемов, что позволяет совершенствовать оценку их гидробиологического и гидрохимического статусов.

Ключевые слова: экология, биоиндикация, водоемы, биохимические исследования, легочные пресноводные моллюски

Оценка гидробиологического и гидрохимического статусов водоемов согласно Водному кодексу Республики Беларусь (2015 г.) аналогична практике Европейского союза и отвечает критериям Водной рамочной директивы ЕС. Основными компонентами, определяющими качество поверхностных вод являются соединения, поступающие в составе бытовых, сельскохозяйственных и промышленных стоков, а также долгосрочные последствия аварии на Чернобыльской атомной электростанции. В 2020 году предусмотрен пересмотр Водной стратегии Республики Беларусь, что делает актуальным проведение дополнительных исследований по оценке экологического состояния водоемов с учетом их локализации в загрязненных радионуклидами территориях. Целью работы явилось использование биохимических методов в сравнительной гидробиологической характеристике двух водоемов Витебской и Гомельской областей.



Материал и методы. В качестве эталонного (модельного) водоема принято озеро Будовесь Шумилинского района (агрогородок Башни) Витебской области, поскольку оно отличается чистой водой из-за практически полного отсутствия промышленных и бытовых стоков, а также отсутствия загрязнения радионуклидами. Озеро сравнения - Любенское находится в Гомельском районе Гомельской обл., расположено на южной окраине Гомеля и относится к бассейну р. Сож (левый приток р. Днепр). Является озером пойменного типа (площадь 14 га). Существенное влияние на экологическое состояние озера оказывает хозяйственная деятельность человека. Основными источниками загрязнения поверхностных вод являются промышленные, бытовые и ливневые сточные воды, атмосферные осадки и газодымовые выбросы. Озеро Любенское характеризуется высоким содержанием растворенных органических веществ. Прозрачность воды в озере низкая; радиационное загрязнение – умеренное.

Биохимическому исследованию подвергались гемолимфа и гепатопанкреас легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода: обыкновенный прудовик (*Lymnaea stagnalis* L, переносчик кислорода медь-содержащий гемоцианин) и роговая катушка (*Planorbarius corneus* L, переносчик кислорода железо-содержащий гемоглобин). Гемолимфу получали посредством раздражения ноги лёгким покалыванием, что стимулирует рефлекс втягивания ноги в раковину и выделение гемолимфы из мантийной полости.

Определение биохимических показателей в гемолимфе проводили с помощью стандартных наборов реагентов НТПК «Анализ X» и выражали в следующих единицах: общий белок в г/л; мочевины, глюкозы, общий холестерол (ОХС), холестерол липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триацилглицеролы (ТГ) в ммоль/л; мочевины и креатинина в мкмоль/л; активность гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), аспартат-аминотрансферазы (АсАТ) и аланин-аминотрансферазы (АлАТ) в Ед/л; активность супероксиддисмутазы (СОД) в % от аутоокисления кверцетина; активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) в мкмоль/мл/мин. Определение концентрации белка (мг/г ткани) проводили по методу Лоури [2]. Содержание ДНК и РНК (мг/г ткани) устанавливали по методу Blober и Potter [3]. Уровень гликогена оценивали методом Krisman [4]. Содержание ТБК-ПВ определяли по реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в результате которой образуется триметиновый комплекс, окрашенный в розовый цвет [5]. Активность каталазы определяли методом, основанным на измерении количества неразложившегося H_2O_2 после инкубации с каталазой, определяемого реакцией с молибдатом аммония [6]. Содержание восстановленного глутатиона определяли по реакции взаимодействия SH-групп глутатиона с ДТНБК (реактивом Элмана) при pH 8,0, в ходе которой высвобождается тионитрофенильный анион, которой обладает интенсивной желтой окраской [7]. Метод определения активности глутатионредуктазы основан на измерении скорости окисления НАДФН. Активность супероксиддисмутазы оценивалась по степени торможения ферментом



аутоокисления кверцетина. Активность глутатионпероксидазы определяли методом основанным на измерении количества не прореагировавшего с H_2O_2 GSH, определяемого реакцией с ДТНБК [8]. В гомогенате гепатопанкреаса выражали содержание белка, ДНК, РНК, гликогена (в мг/г); ТБК-позитивных веществ (малоновый диальдегид, МДА) в нмоль/г; восстановленного глутатиона (Г-SH) в мкмоль/г; активность каталазы, АсАТ, АлАТ, амилазы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и ГР в мкмоль/г/мин, а СОД в %. Средняя величина каждого показателя определялась в 8-10 повторностях, и сравнительный анализ производился методом параметрической статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Полученные результаты и обсуждение. Результаты биохимических исследований гемолимфы и гепатопанкреаса представлены в таблице 1.

Сравнение биохимических показателей между двумя видами легочных пресноводных моллюсков, обитающих в одном озере, выявило межвидовые различия как в показателях гемолимфы, так и гепатопанкреаса. У *Planorbarius corneus* по сравнению с *Lymnaea stagnalis*, обитающих в оз. Будовесть, в гемолимфе повышено 5 показателей (содержание общего белка, мочевой кислоты, глюкозы, ХС ЛПВП и активность СОД) и снижены 3 показателя (содержание ОХС, ТГ и креатинина). Такой характер изменений биохимических показателей в плазме крови человека обычно рассматривается как целевой, положительный [9]. В гепатопанкреасе оказались повышенными 4 показателя (активность АлАТ, амилазы, ЛДГ и ГР) и снижены содержание гликогена (соответствует повышению уровня глюкозы в гемолимфе) и восстановленного глутатиона. Следовательно, у роговых катушек из оз. Будовесть, вероятно, более интенсивны превращения углеводов и азотсодержащих соединений на фоне более адекватного транспорта холестерина.

У *Planorbarius corneus* по сравнению с *Lymnaea stagnalis*, обитающих в оз. Любенское, в гемолимфе повышено 5 показателей (содержание общего белка, мочевины, мочевой кислоты, глюкозы, ХС ЛПВП и активность СОД) и снижены 2 показателя (содержание ОХС и ТГ). Приведенные изменения совпадают с таковыми в гемолимфе роговых катушек, обитающих в оз. Будовесть. В гепатопанкреасе роговых катушек, обитающих в оз. Любенское, по сравнению с прудовиками повышено 8 показателей (содержание ДНК, РНК и активность АлАТ, амилазы, ЛДГ, каталаза, СОД, ГР) и снижены 2 показателя (содержание гликогена и активность АсАТ). На основании приведенных данных можно полагать, что в условиях экологического и радиационного загрязнения среды обитания у роговых катушек большее количество биохимических процессов включается в поддержание жизнеспособности организма в том числе, вероятно, и на уровне экспрессии генов.

Проведенный сравнительный анализ позволил выявить некоторые отличия в биохимических показателях двух видов легочных пресноводных моллюсков обитающих в разных водоемах. Так, в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* из озера Любенское оказалось повышенным содержание мочевой кислоты, на фоне снижения уровней ОХС, ТГ, креатинина и активности АлАТ.



Таблица 1

**Сравнительная характеристика биохимических показателей тканей
легочных пресноводных моллюсков в зависимости от места обитания**

Показатель	оз. Будовесть, Витебская область		оз. Любенское, Гомельская область	
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Planorbarius corneus</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Planorbarius corneus</i>
Гемолимфа				
Общий белок	14,9±0,24	36,3±1,62 ¹	13,8±0,16	23,2±0,35 ^{1,2}
Мочевина	6,65±0,18	6,43±0,10	6,21±0,11	6,94±0,06 ^{1,2}
Мочевая к-та	30,4±0,76	89,1±2,00 ¹	60,5±1,23 ²	121±1,97 ^{1,2}
Глюкоза	0,54±0,04	1,15±0,08 ¹	0,61±0,02	0,89±0,02 ^{1,2}
ОХС	0,49±0,01	0,33±0,01 ¹	0,41±0,02 ²	0,31±0,02 ¹
ХС ЛПВП	0,06±0,01	0,11±0,01 ¹	0,07±0,01	0,14±0,01 ¹
ТГ	0,35±0,01	0,23±0,01 ¹	0,29±0,01 ²	0,23±0,02 ¹
Креатинин	75,5±3,33	51,6±3,90 ¹	53,4±6,75 ²	50,7±7,68
ГГТ	187±9,42	178±7,70	180±8,55	169±12,0
АсАТ	43,0±2,42	40,9±0,75	39,2±0,66	39,3±0,80
АлАТ	30,6±1,95	29,2±2,66	21,8±0,66 ²	22,8±1,24
СОД	45,7±1,22	59,4±2,11 ¹	47,9±1,55	60,9±2,90 ¹
ГП	5,20±0,38	5,97±0,37	4,84±0,28	4,30±0,54 ²
ГР	258±9,61	275±7,21	291±7,21	270±8,64
Гепатопанкреас				
Общий белок	203±4,30	205±7,50	229±6,40	250±7,07 ²
ДНК	2,44±0,08	2,73±0,29	2,62±0,06	3,11±0,05 ¹
РНК	7,46±0,28	6,79±0,58	7,90±0,01	8,93±0,20 ^{1,2}
Гликоген	27,0±0,36	21,1±0,11 ¹	5,44±0,43 ²	5,02±0,48 ²
АсАТ	5,54±0,27	4,88±0,37	5,66±0,29	4,02±0,64 ¹
АлАТ	2,82±0,16	4,01±0,10 ¹	1,95±0,16 ²	4,13±0,14 ¹
Амилаза	334±8,19	402±21,7 ¹	289±10,4	440±26,9 ¹
ЛДГ	21,1 ±1,25	36,3±1,28 ¹	16,2±1,15 ²	41,1±1,15 ^{1,2}
ТБК-ПВ	5,30±0,38	5,08±0,78	42,8±2,50 ²	37,0±1,98 ²
Г-SH	9,18±0,05	8,87±0,09 ¹	1,35±0,06 ²	1,45±0,22 ²
Каталаза	52,5±3,00	47,8 ±1,70	6,09±0,11 ²	10,4±0,07 ^{1,2}
СОД	67,1±1,38	70,7±2,21	70,1±1,07	74,5±1,04 ¹
ГР	184±14,6	333±30,0 ¹	209±40,9	393±20,3 ¹

Примечание: ¹ – P<0,05 при сравнении показателей моллюсков из одного водоема; ² - P<0,05 при сравнении показателей моллюсков из сравниваемых водоемов

В гепатопанкреасе этих моллюсков было повышено содержание гликогена и МДА при снижении количества восстановленного глутатиона, а также частичном ингибировании АлАТ, ЛДГ и каталазы. В гемолимфе *Planorbarius corneus* из этого же озера выявлено повышенное содержание мочевины и мочевой кислоты и сниженные уровни общего белка и глюкозы, а в



гепатопанкреасе – повышенное содержание общего белка, РНК, гликогена, МДА и повышение активности ЛДГ при снижении уровня восстановленного глутатиона и активности каталазы.

Заключение. Полученные результаты показывают, что в водоеме Гомельской области у легочных пресноводных моллюсков наблюдается более интенсивный распад нуклеиновых кислот (повышение мочевиной кислоты), вероятно, за счет процессов окислительного стресса (повышение уровня МДА, снижение содержания восстановленного глутатиона и активности каталазы при относительном истощении запасов гликогена).

Наряду с признанным модельным организмом для оценки гидробиологического статуса водной среды обитания *Lymnaea stagnalis* целесообразно оценивать также биохимические процессы адаптационного плана в тканях *Planorbarius corneus*.

Литература

1. Чиркин, А.А. Липидный обмен / А.А. Чиркин [и др.] // Медицинская литература. – М., 2003. – 122с.
2. Lowry, O.H Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H Lowry // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.
3. Blober, G. Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and pools of RNA in the nuclear, nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid / G. Blober, V.R. Potter // Biochem. Biophys. Acta – 1968. – Vol. 166. – P. 48-54.
4. Krisman, C.R. A method for the colometric estimation of glycogen with iodine / C.R. Krisman // Anal. Biochem. – 1962. – Vol. 4. – P. 17–23.
5. Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // Analit. Biochem. – 1987. – Vol. 86. - P. 271-278.
6. Королюк, М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
7. Beutler E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods / E. Beutler.- Grune & Stration, Orlando, 1990. – P.131–134.
8. Современные проблемы биохимии: методы исследований : учебное пособие для магистрантов учреждений высшего образования, по биологическим и медицинским специальностям / [Е. В. Барковский и др.] ; под редакцией А. А. Чиркина // Минск : Вышэйшая школа. – 2013. – 490с.
9. Чиркин, А.А. Клинический анализ лабораторных данных / А.А. Чиркин. – М.: Мед. лит., 2012. - 384 с.

Abstract. The article describes a method for the ecological analysis of reservoirs based on the use of biochemical methods for studying tissues of two species of pulmonary freshwater mollusks that differ in the mechanisms of oxygen transport. It has been established that in the Gomel Region pond, more intensive decay of nucleic acids is observed in pulmonary freshwater mollusks (increase of uric acid), probably due to oxidative stress processes (increase in MDA level, decrease in the content of reduced glutathione and catalase activity with relative depletion of glycogen reserves). Along with the recognized model organism for evaluating the hydrobiological status of the aquatic



*habitat of *Lymnaea stagnalis*, it is also worthwhile to evaluate the biochemical processes of the adaptation plan in the tissues of *Planorbarius corneus*. The proposed method extends the possibilities of bioindication of reservoirs, which allows improving the assessment of their hydrobiological and hydrochemical status.*

Keywords: *ecology, bioindication, water bodies, biochemical studies, pulmonary freshwater mollusks*

References

1. Chirkin A.A. Lipidni obmen / A.A. Chirkin [et al.] // Med. lit. – M., 2003. – 122 p.
2. Lowry O.H Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H Lowry // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.
3. Blober G. Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and pools of RNA in the nuclear, nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid / G. Blober, V.R. Potter // Biochem. Biophys. Acta – 1968. – Vol. 166. – P. 48-54.
4. Krisman C.R. A method for the colometric estimation of glycogen with iodine / C.R. Krisman // Anal. Biochem. – 1962. – Vol. 4. – P. 17–23.
5. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // Analit. Biochem. – 1987. – Vol. 86. - P. 271-278.
6. Koroluk M.A. Metod opredelenia aktivnosti katalasi / M. A. Koroluk// Laboratornoe delo. – 1988. – № 1. – P. 16–19.
7. Beutler E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods / E. Beutler.- Grune & Stration, Orlando, 1990. – P.131–134.
8. Sovremennie problem biochimii: metodi issledovaniy: yчебное posobie / [E. W. Barkowski et al.]; pod red. A. A. Chirkina // Minsk: Wisheish. shkola. – 2013. – 490 p.
9. Chirkin A.A. Klinicheski analis laboratornich dannich / A.A. Chirkin – M.: Med. lit., 2012. - 384 p.

Статья отправлена 21 апреля 2018 г.

©А.А.Чикин