

Использование лёгочных пресноводных моллюсков в биомониторинге и биомоделировании

А. А. Чиркин, профессор кафедры химии Витебского государственного университета имени П. М. Машерова,

М. В. Демидаш, учитель биологии первой квалификационной категории гимназии № 2 г. Витебска,

М. А. Смолякова, ученица X класса гимназии № 2 г. Витебска

Введение

Экологический мониторинг окружающей среды включает анализ состояния естественных экологических систем с целью выявления негативных процессов, прежде всего для биоты. Среди подсистем экологического мониторинга важную роль играют биологический мониторинг, основанный на исследовании и регистрации особенностей реакций живых организмов на загрязнение окружающей среды, и мониторинг здоровья населения, который включает систему мероприятий по наблюдению, анализу, оценке и прогнозу состояния физического здоровья населения. Обе подсистемы, дополняя друг друга, служат для обеспечения условий существования живых организмов при действии неблагоприятных экологических факторов.

Для биомониторинга в ряде стран ЕС используют два широко распространённых лёгочных пресноводных моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик) и *Planorbarius corneus* (катушка). Первый из них признан модельным организмом для исследования действия водорастворимых химических агентов в ЕС в 2010 году. В Республике Беларусь эти моллюски также используются в биоэкологических исследованиях учёными БГУ, Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Гродненского государственного университета имени Я. Купалы и некоторых других учреждений.

Биомоделирование относится к методам создания моделей биологических систем с заданными свойствами. Биологическое моделирование является важной задачей системной

и математической биологии. Вычислительные системы биологии нацелены на развитие и использование эффективных алгоритмов анализа данных, визуализации процессов и механизмов, взаимосвязей процессов методами компьютерного моделирования метаболических путей, внутриклеточного сигналинга, регуляции экспрессии генов, визуализации работы генных сетей и пр. В медико-биологической практике биомоделирование чаще всего используется для воспроизведения процессов, связанных с человеком, на более простых живых организмах. Например, существует Центр экспериментального биомоделирования в структуре Института экспериментальной медицины Санкт-Петербурга. Основная задача Центра — разработка и валидация экспериментальных моделей патологии на мелких лабораторных грызунах. Методы моделирования включают хирургическую модификацию животных, воздействие физических и химических внешних факторов. В Центре экспериментального биомоделирования проводятся скрининговые исследования эффективности фармакологических субстанций и экспериментальных образцов медицинского назначения. К такому типу исследований относятся исследования на базе кафедры химии БГУ имени П. М. Машерова: открытие мощной антиоксидантной системы содержимого куколок дубового шелкопряда с разработкой препарата для борьбы с инсулинорезистентностью и его апробацией на модели этого состояния у лабораторных крыс. Однако в последние годы использование млекопитающих для

экспериментальных исследований подвергается критике по этическим и экономическим причинам. Известно, что только в Японии в фармакологической промышленности уничтожается ежегодно 6–10 миллионов крыс. Стоимость каждого животного составляет от 5 долларов США и выше. Поэтому на первое место выходят исследования на клеточных культурах. Но работа по культивированию клеток требует специального дорогостоящего оборудования и расходных материалов, а также высококвалифицированных специалистов. Кроме того, технологии культивирования не позволяют исследовать межклеточные и межтканевые взаимодействия. Этих недостатков можно избежать, если проводить исследования на относительно простых животных, например лёгочных пресноводных моллюсках, у которых представлены практически все системы органов и типы клеток, присущих для высших млекопитающих, но в упрощённом виде.

Цель исследования: выявить особенности транспорта липидов и содержания глюкозы в гемолимфе двух видов лёгочных пресноводных моллюсков, отличающихся по характеру транспорта кислорода, для оценки экологического состояния водных сред обитания и возможности моделирования метаболического синдрома.

Задачи исследования:

- исследовать массу тела моллюсков в зависимости от места обитания;
- определить содержание холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности, триглицеридов и глюкозы в гемолимфе моллюсков в зависимости от места обитания;
- сформулировать предложения для оптимизации биомониторинга водных сред обитания с помощью гравиметрического и биохими-

Характеристика лёгочных пресноводных моллюсков

Два широко распространённых лёгочных пресноводных моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик) и *Planorbis corneus* (катушка) обладают отличающимися системами транспорта кислорода [3]. Морфометрические показатели моллюсков тесно связаны с условиями биотопов: разнообразием растительности, температурным режимом, кормовой базой, релье-

ческого анализа моллюсков с разными типами транспорта кислорода;

- провести поиск соотношений изучаемых показателей, совпадающих с таковыми при развитии метаболического синдрома у человека, для оценки возможности моделирования этого состояния у моллюсков.

Работа осуществлялась в рамках деятельности кафедры химии ВГУ имени П. М. Машерова по поиску и воспитанию одарённых школьников.

В данной работе проводится сравнение двух достаточно близких видов пресноводных моллюсков, обитающих в однотипных водных системах, но обладающих разными механизмами транспорта кислорода (медь-содержащий белок гемоцианин у прудовиков и железо-содержащий белок гемоглобин у катушек) [1]. Предполагается, что биохимические системы биологических сред моллюсков могут отвечать изменением показателей метаболизма на химические изменения среды обитания. Эти данные имеют фундаментальное значение, поскольку они способствуют пониманию, почему в процессе эволюции сохранились близкородственные виды в одних и тех же водоёмах, но с отличающимися системами транспорта кислорода. Практическое значение выполняемой работы может заключаться в: 1) приближении экологического мониторинга химических загрязнений водных сред к методам, используемым в ЕС; 2) создании модели метаболического синдрома как процесса, развивающегося в результате нарушений экологии человека; 3) обосновании возможности использования лёгочных пресноводных моллюсков для испытания биологически активных субстанций на простых живых системах, в которых доставка вещества к клетке-мишени не регламентируется сосудистой стенкой [2].

фом местности, степенью неблагоприятного воздействия внешних факторов среды. В настоящее время большую значимость имеет оценка экологического состояния биотопов с использованием в качестве биоиндикаторов лёгочных моллюсков. *Lymnaea stagnalis* имеет раковину длиной до 7 см и шириной до 3,5 см, спирально закрученную с 4–5 оборотами, с одной

стороны она заканчваецца острой вершиной, а с другой — имеет отверстие. Обитает в прибрежной полосе постоянных и временных, проточных и стоячих водоёмов, в зарослях водной растительности. Имеет двухлетний жизненный цикл, при котором размножение становится возможным на второй год после первой зимовки. *Planorbarius corneus* имеет длину тела до 4 см, раковину в виде спирали, завёрнутую в одной плоскости, тёмно-коричневого цвета. Обитает на дне, в стоячих водоёмах с обильной водной растительностью. Зимуют на глубине 1–1,5 м. Жизненный цикл двухлетний, при котором моллюски размножаются в начале и в конце второго года жизни. Наиболее широко используется методика измерения параметров раковины моллюсков по Е. М. Хейсину [4].

Для общей оценки состояния метаболизма в организме целесообразно определить количество одного из конечных продуктов. Таким продуктом может быть холестерол, который представляет собой конечную молекулу, выделяемую из организма в виде желчных кислот. Следует отметить, что на базе холестерола формируются также важнейшие низкомолекулярные биорегуляторы:

глюкокортикоиды, минералокортикоиды, половые гормоны, витамин D и кальцитриол. В конце 60-х и начале 70-х годов XX века было показано, что лёгочные пресноводные моллюски *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus* способны синтезировать вещества стероидной природы из ацетата [5; 6]. В документе (JT03284405. Environment Directorate. Paris 2010) приведены данные, что цепи реакций биосинтеза стероидных веществ у этих моллюсков практически не отличаются от аналогичных реакций у человека. Холестерол плохо растворим в воде, поэтому он выделяется с желчью, а не с мочой. В связи с этим целесообразно определить содержание одной из важнейших транспортных форм данного стероида — липопротеинов высокой плотности. Учитывая, что в данной работе исследуются долгосрочные эффекты адаптации моллюсков к вредным компонентам водной среды обитания, необходимо изучить также наличие краткосрочных и долгосрочных резервов энергии, а именно: содержание глюкозы и триглицеридов [7; 8]. Все эти показатели имеют отношение к метаболическому синдрому, вызванному развитием инсулинорезистентности.

Метаболический синдром и экология человека

Метаболический синдром (МС) является одной из ведущих причин случаев внезапной смерти в состоянии видимого здоровья. Поэтому исследования, связанные с изучением причин и, прежде всего, молекулярных механизмов развития МС, являются актуальными. Расшифровка биохимических механизмов развития и создания критериев выявления МС рассматривается скорее как биологическая проблема, поскольку возникновение компонентов этого синдрома тесно сопряжено с общими негативными явлениями урбанизации общества. Осложнения МС проявляются в виде артериальной гипертензии, инсулиннезависимого сахарного диабета, клинической картины атеросклероза и др., которые являются важнейшей медицинской проблемой. Распространённость МС составляет 25–35 % населения. В возрасте старше 60 лет доля лиц с МС составляет 42–43,5 %. Общее число взрослых, страдающих от синдрома, было оценено в

22 %, при этом уровень соматического неблагополучия среди людей в возрасте 20–29 лет составил 6,7 %, среди 60-летних — 43,5 %. Распространённость МС среди мужчин — 24 %, среди женщин — 23,4 % [9; 10]. Метаболический синдром является одной из важнейших причин нарушения здоровья, связанного с отходом от принципов здорового образа жизни. Актуальность исследований, связанных с проблемой МС, подтверждается также данными, которые получены в рамках концепции радиационно-индуцированного атеросклероза. Важность такого направления научного поиска подтверждается тем, что большие территории в центральной части Европы были в той или иной степени загрязнены радионуклидами после аварии на ЧАЭС [11]. Минимальный перечень рутинных признаков метаболического синдрома у человека включает повышенную массу тела, повышенное артериальное давление, повышенное содержание в

крови глюкозы и триглицеридов и сниженное содержание липопротеинов высокой плотности [12]. В качестве экспериментальных моделей МС используются животные с каким-либо генетическим дефектом, приводящим к развитию различных патологических изменений, характерных для МС у людей. Чаще всего используют следующих животных: крысы Zucker с ожирением и сахарным диабетом 2-го типа, спонтанно-гипертензивные крысы с ожирением, мыши db/db и др. Кроме того, существуют методики по индукции этих нарушений путём внешних воздействий — химических препаратов и/или диеты [13].

Таким образом, можно сделать следующие выводы: 1) биохимические исследования гемолимфы моллюсков могут продемонстрировать метаболические нарушения, связанные с экологическим состоянием среды обитания; 2) если в спектре выявленных биохимических изменений будут найдены критерии метабо-

лического синдрома, то можно развивать исследование по моделированию этого состояния у лёгочных пресноводных моллюсков. При этом обитание в водной среде этих животных позволит при биомоделировании точно дозировать поступление веществ в хроническом опыте и субстанций для предотвращения развития инсулинорезистентности. Кроме того, 1) новые факты могут быть получены при исследовании тканей не только прудовиков (транспорт кислорода гемоцианином, индикатор третьей степени чистоты водоёма), но и катушек (транспорт кислорода гемоглобином, индикатор второй степени чистоты водоёма); 2) исследование следует провести с целью оценки взаимосвязей морфометрических показателей с интегральными показателями метаболизма, например спектром показателей развития метаболического синдрома, зависимых от экологического состояния среды обитания.

Материалы и методы исследования

Опыты поставлены на 90 лёгочных пресноводных моллюсках, разделённых на две группы: 45 особей *Lymnaea stagnalis* (прудовик) и 45 особей *Planorbarius corneus* (роговая катушка). Моллюски собирались студентами I и II ступеней высшего образования в летне-осеннем периоде, поскольку в это время стабилизируются морфометрические и биохимические параметры животных. Моллюски были собраны в пяти водоёмах Витебской области: р. Витьба в черте г. Витебска и в озёрах Будовесь, Афанасьевское, Дубровское и Селявское. Река Витьба перегорожена плотиной, что сформировало слабо проточный водоём с очевидными последствиями антропогенной нагрузки. Озеро Селявское отличается чистотой из-за практически полного отсутствия водосток из ферм и населённых пунктов и рассматривается в данной работе как контрольный водоём.

Все моллюски взвешивались на весах Scout Pro, и в предоставленных образцах гемолимфы определялись биохимические показатели. Определение количественного содержания общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов и глюкозы проводили с помощью стандартных наборов НТПК «Анализ-Х» под контролем аспирантов В. В. Долматовой и Е. И. Кацнельсон в лаборатории кафедры химии ВГУ имени П. М. Машерова. Содержание исследованных компонентов гемолимфы выражали в ммоль/л, а массы тела — в г. Все полученные материалы вводились в электронные таблицы и обрабатывались методом параметрической вариационной статистики по Стьюденту с определением средней величины M , ошибки средней — $\pm m$, а также значений t и P . Достоверными считались различия при значениях t больше 2,1 и значениях P меньше 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице приведены данные о массе тела и биохимических показателях гемолимфы моллюсков, обитающих в разных по экологическому благополучию водоёмах.

Таблица — Масса тела и биохимические показатели гемолимфы лёгочных пресноводных моллюсков, обитающих в природных водоёмах, $M \pm m$

Район сбора моллюсков	Показатель				
	ОХС (ммоль/л)	ХС ЛПВП (ммоль/л)	ТГ (ммоль/л)	Глюкоза (ммоль/л)	Масса (г)
<i>Lymnaea stagnalis</i>					
Оз. Селявское	0,57 ± 0,007	0,13 ± 0,009	0,23 ± 0,008	0,96 ± 0,076	8,22 ± 0,14
Оз. Будовесть	0,49 ± 0,011 ¹	0,06 ± 0,009 ¹	0,35 ± 0,008 ¹	0,80 ± 0,034	8,47 ± 0,25
Оз. Афанасьевское	0,50 ± 0,018 ¹	0,09 ± 0,008 ¹	0,40 ± 0,006 ¹	0,51 ± 0,042 ¹	8,41 ± 0,10
Оз. Дубровское	0,56 ± 0,015	0,07 ± 0,008 ¹	0,35 ± 0,008 ¹	0,55 ± 0,047 ¹	10,02 ± 0,34 ¹
Река Витьба	0,42 ± 0,020 ¹	0,06 ± 0,013 ¹	0,30 ± 0,008 ¹	0,60 ± 0,035 ¹	8,49 ± 0,11
<i>Planorbarius corneus</i>					
Оз. Селявское	0,48 ± 0,008	0,16 ± 0,005	0,20 ± 0,011	0,87 ± 0,062	6,82 ± 0,19
Оз. Будовесть	0,33 ± 0,011 ¹	0,07 ± 0,006 ¹	0,23 ± 0,011	1,54 ± 0,086 ¹	7,68 ± 0,25 ¹
Оз. Афанасьевское	0,28 ± 0,012 ¹	0,06 ± 0,003 ¹	0,32 ± 0,006 ¹	0,96 ± 0,045	5,48 ± 0,15 ¹
Оз. Дубровское	0,37 ± 0,014 ¹	0,07 ± 0,007 ¹	0,23 ± 0,01	0,85 ± 0,088 ¹	7,85 ± 0,19 ¹
Река Витьба	0,32 ± 0,022 ¹	0,12 ± 0,006 ¹	0,19 ± 0,008	1,21 ± 0,022 ¹	6,49 ± 0,12

Примечание. ¹ — $P < 0,05$ при сравнении с показателями моллюсков из оз. Селявское.

Из анализа данных таблицы следует, что общим типом изменений транспорта липидов у обоих видов лёгочных пресноводных моллюсков по сравнению с моллюсками из контрольного водоёма является снижение содержания общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности. Кроме того, в гемолимфе *Lymnaea stagnalis*, обитающих в обследуемых водоёмах, по сравнению с обитающими в озере Селявское повышено содержание триглицеридов. Эти данные свидетельствуют о том, что в обследованных водоёмах Витебской области имеются загрязнения, вызывающие, вероятно, усиленный синтез стероидных гормонов из холестерина (признак хронического стресса, направленного на активацию глюконеогенеза) и начальные стадии повреждения печени, ведущие к ослаблению

обратного транспорта холестерина из периферических тканей в составе липопротеинов высокой плотности. Повышение уровня триглицеридов в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* является, по всей видимости, результатом мобилизации долгосрочных липидных резервов в условиях снижения содержания глюкозы. У моллюсков из озера Дубровское выявлены 3 критерия метаболического синдрома: повышение массы тела и уровня триглицеридов на фоне уменьшения холестерина липопротеинов высокой плотности.

Проведённые исследования также показали, что у *Planorbarius corneus*, обитающих в озере Будовесть, выявлены 3 критерия метаболического синдрома — повышение массы тела и уровня глюкозы на фоне снижения холестерина липопротеинов высокой плотности.

У моллюсков из озера Афанасьевское — 2 критерия (повышение уровня триглицеридов и снижение ХС ЛПВП), у моллюсков из озера Дубровское — 2 критерия (повышенная масса тела на фоне снижения ХС ЛПВП при нормальном уровне глюкозы) и у моллюсков из реки Витьба — 2 критерия (повышенный уровень глюкозы и сниженное содержание ХС ЛПВП при нормальной массе тела).

Полученные результаты показывают, что лёгочные пресноводные моллюски возможно использовать как тест-организмы для изучения управления уровнем холестерина эндогенными и экзогенными биорегуляторами. Тип транспорта кислорода не оказывает влияния на особенности изменений общего холестерина

и холестерина липопротеинов высокой плотности. Реактивность процессов транспорта триглицеридов и глюкозы имеет явные видовые различия, что связано, вероятно, с типом транспорта кислорода.

Следовательно, *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus* могут явиться перспективными тест-организмами для исследования инсулинорезистентности. Используя данные организмы, можно получить наиболее важную информацию о развитии инсулинорезистентности на уровне клеток печени из-за анатомической близости клеток печени и клеток — продуцентов инсулина. Важно, что гемолимфа омывает оба типа клеток без преодоления сосудистых стенок.

Заключение

Представленные данные показывают, что лёгочные пресноводные моллюски могут быть важным компонентом процесса биомониторинга загрязнения водоёмов. Эти относительно простые живые организмы чувствительны к действию неблагоприятных экологических факторов в водных средах обитания и тем самым дополняют исследования химического состава воды [14; 15]. Результатом их использования в биомониторинге создаётся многогранная картина взаимодействия загрязняющих химических факторов с реактивностью биоты на них. Использование двух широко распространённых видов лёгочных пресноводных моллюсков с разными механизмами транспорта кислорода позволяет получить дополнительную информацию о реактивности тканей организмов на химическое загрязнение среды обитания. Одним из важнейших патологических процессов, возникающих в процессе жизни лёгочных пресноводных моллюсков, являются изменения транспорта

липидов и глюкозы в гемолимфе наподобие метаболического синдрома у человека. Это не удивительно, поскольку инсулин регулирует обмен молекул, являющихся транспортными формами энергии у всех многоклеточных организмов. По всей видимости, резистентность к инсулину, т. е. устойчивость к регулирующему действию этой сигнальной молекулы, может развиваться у многих организмов. Поэтому *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus* могут быть модельными организмами, позволяя через свои видовые особенности метаболизма получать более полную информацию о механизмах развития и предупреждении развития метаболического синдрома. Ранее было показано, что у лёгочных пресноводных моллюсков можно воспроизвести стрептозотоциновую гипергликемию [2]. Стоимость содержания этих животных даже в условиях аквакультуры в сотни раз меньше, чем стоимость экспериментов на млекопитающих.

Выводы

1. Лёгочные пресноводные моллюски возможно использовать как тест-организмы для изучения транспорта липидов и глюкозы между тканями организма.

2. Тип транспорта кислорода не оказывает влияния на особенности изменений уровней общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности в гемолимфе моллюсков.

3. Тип транспорта кислорода определяет видовые особенности транспорта триглицеридов и глюкозы в гемолимфе моллюсков.

4. В гемолимфе моллюсков, обитающих в разных озёрах, удаётся выявить по 2–3 биохимических признака метаболического синдрома у человека.

Перспективы исследования

1. Необходимо, используя два вида вторичноводных моллюсков и изложенные выше материалы, найти по соотношению аэробных и анаэробных процессов в тканях этих животных молекулярно-биологические критерии экологического состояния водных сред их обитания.

2. Целесообразно дополнительно к признанному модельным организмом для оценки химических загрязнений воды *Lymnaea stagnalis* (прудовик) научно обосновать при-

знание модельным организмом *Planorbarius corneus* (катушка). Это связано с тем, что в существующих правилах добротной лабораторной практики (GLP) требуется проведение испытаний, как минимум, с использованием двух видов модельных организмов.

3. Следует экспериментально обосновать способ моделирования инсулинорезистентности на лёгочных пресноводных моллюсках, отличающихся по типу транспорта кислорода.

Список использованной литературы

1. Биологическая активность продуктов гистолиза / А. А. Чиркин, Е. И. Коваленко, Т. А. Толкачёва. — Saarbruecken : Lambert Academic Publishing GmbH, 2012. — 155 p.
2. Чиркин, А. А. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у лёгочных пресноводных моллюсков / А. А. Чиркин [и др.] // Новости медико-биологических наук. — 2016. — Т. 14. — № 3. — С. 28–32.
3. Биохимия филогенеза и онтогенеза: учеб. пособие / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко, С. Б. Бокуть. — Минск : Новое знание; М. : ИНФРА-М, 2012. — 288 с.
4. Хейсин, Е. М. Краткий определитель пресноводной фауны / Е. М. Хейсин. — 2-е изд. — М. : Государственное учебно-педагогическое издательство Министерства просвещения РСФСР, 1962. — 148 с.
5. Voogt, P. A. Investigations of the capacity of synthesizing 3β -sterols in mollusca. II. Study on the biosynthesis of 3β -sterols in some representative of the order basommatophora / P. A. Voogt // Comparative Biochemistry and Physiology. — 1968. — Vol. 25, 3. — P. 943–948.
6. Voogt, P. A. A gaschromatographic analysis of the sterols of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* / P. A. Voogt // Arch. Internat. Physiol. Biochim. — 1972. — Vol. 80, 4. — P. 697–704.
7. Биохимия: учебное руководство / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — М. : Мед. Лит., 2010. — 624 с.
8. Биологическая химия: учебник / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — Минск : Вышэйшая школа, 2017. — 431 с.
9. Перова, Н. В. Метаболический синдром: патогенетические взаимосвязи и направления коррекции / Н. В. Перова, В. А. Метельская, Р. Г. Оганов // Кардиология. — 2001. — № 3. — С. 4–9.
10. Чазова, И. Е. Метаболический синдром / И. Е. Чазова, В. Б. Мычка. — М. : МедиаМедика, 2004. — 168 с.
11. Чиркин, А. А. Атеросклероз и радиация / А. А. Чиркин // Рецепт. — 2000. — № 4(13). — С. 91–94.
12. Чиркин, А. А. Рутинные биохимические исследования при анализе роли стрессового воздействия в патогенезе метаболического синдрома / А. А. Чиркин // Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия, II Международный симпозиум, Гродно, Республика Беларусь, 30 сентября – 2 октября 2015 г.: сб. статей. — Гродно : ГрГУ им. Я. Купалы, 2015. — С. 175–181.
13. Кравчук, Е. Н. Экспериментальные модели метаболического синдрома / Е. Н. Кравчук, М. Н. Галагудзе // Артериальная гипертензия. — 2014. — Т. 20. — № 5. — С. 377–383.
14. Биотестирование — составной элемент оценки состояния окружающей среды: учеб.-метод. пособие / С. Е. Дромашко, С. Н. Шевцова. — Минск : ИПНК, 2012. — 82 с.
15. Шевцова, С. Н. Воздействие солей тяжёлых металлов на эмбриологические, репродуктивные и цитогенетические показатели брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* L: автореф. дис. ... на соискание учёной степени канд. биол. наук по специальности: 03.02.08 (экология) / С. Н. Шевцова. — Минск, 2016. — 24 с.