

УДК [(576.89:577.15):594](28)

*Н. А. Красуцкая, В. И. Юришинец***ВЛИЯНИЕ ТРЕМАТОДНОЙ ИНВАЗИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА И АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ГЕПАТОПАНКРЕАСЕ МОЛЛЮСКОВ *VIVIPARUS VIVIPARUS* L. ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ВОДНОЙ СРЕДЫ**

Установлена зависимость между содержанием общего белка, активностью сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в гепатопанкреасе и интенсивностью трематодной инвазии моллюсков при различной температуре водной среды. Показано, что с усилением трематодной инвазии моллюсков в гепатопанкреасе снижается количество общего белка (на 11,67—36,01%) и возрастает активность СДГ (на 11,77—77,21%) по сравнению с контролем. С возрастанием температуры водной среды от 21 до 30°C в гепатопанкреасе инвазированных моллюсков увеличивается содержание общего белка. Наибольшее повышение этого показателя отмечено в гепатопанкреасе инвазированных моллюсков при температуре 26°C. Активность СДГ в гепатопанкреасе высокзараженных моллюсков снижалась с увеличением температуры воды от 21 до 30°C.

Ключевые слова: *Viviparus viviparus*, температура, трематодная инвазия, ферментативная активность.

Температура водной среды является определяющим абиотическим фактором, влияющим на функционирование биологических систем различного уровня [10, 11, 13, 15]. Влияние температуры на биохимические, физиологические, популяционные характеристики гидробионтов остается в центре внимания как актуальная биологическая проблема [3, 4]. Суммарное влияние температуры и паразитов на биологические показатели гидробионтов-хозяев изучено сравнительно недостаточно, а полученная информация является неоднозначной [4]. Активность ферментов является интегральным показателем, который может адекватно отражать особенности метаболизма моллюсков при определенном температурном режиме и паразитарном воздействии. Одним из ключевых ферментов трикарбонового цикла в тканях моллюсков является сукцинатдегидрогеназа [12]. Моллюски, как факультативные анаэробы, выработали в процессе эволюции важный альтернативный механизм адаптации к условиям среды, при котором анаэробный обмен глюкозы может привести к накоплению сукцината [15, 22, 25, 26]. Известно, что повышенный уровень сукцината у моллюсков при анаэробии позволяет митохондриям сохранять свою метаболическую активность до тех пор, пока кислород станет снова доступным [8]. Также в тканях мидий СДГ явля-

© Н. А. Красуцкая, В. И. Юришинец, 2014

ется одной из наиболее активных дегидрогеназ цикла Кребса, и ее предложено использовать как показатель токсичности на ранних этапах воздействия токсиканта [3, 12].

Целью наших исследований было выяснение влияния трематодной инвазии на содержание общего белка и активность СДГ в тканях моллюсков *Viviparus viviparus* L. при различных температурах водной среды.

Материал и методика исследований. Исследования проводили на материале, собранном в оз. Бабьем (водоем г. Киева) в 2006 г. Предварительно выясняли экстенсивность (ЭИ) и интенсивность инвазии (ИИ) моллюсков *V. viviparus*. Выборки моллюсков, гепатопанкреас которых в дальнейшем использовали для определения активности фермента СДГ, в количестве по 100 ос. помещали в 100-литровые аквариумы с отстоянной водопроводной водой, оборудованные газо- и терморегуляторами. Их акклимировали к новым условиям среды в течение 14 сут [14]. Продолжительность опыта составляла 30 сут. По окончании опыта моллюсков подвергали полному паразитологическому вскрытию [5] с определением степени инвазии — экстенсивность инвазии (ЭИ) и интенсивность инвазии (ИИ). После этого гепатопанкреас взвешивали и замораживали при температуре — 18°C. Содержание общего белка определяли биуретовым методом [7]. Активность СДГ (сукцинат:акцептор/-оксидоредуктаза; МКФ 1.3.99.1) оценивали с помощью феррицианидного метода [6]. Полученные результаты обработаны статистически с помощью программы STATISTICA 6.0.

Гепатопанкреас моллюсков в дальнейшем был разделен на четыре группы в зависимости от ИИ и, отчасти, вида трематод:

1 группа — свободные от инвазии моллюски (условный контроль);

2 группа — моллюски с «низкой» ИИ (ИИ от 1 до 100 экз/ос.). Это были моллюски, инвазированные на 99% метацеркариями трематод *Echinoparyphium echinatoides* de Fill и на 1% — метацеркариями трематод *Leucochloridiomorpha constantiae* Mueller;

3 группа — моллюски со «средней» ИИ (ИИ от 400 до 11500 экз/ос.). В эту группу входил гепатопанкреас моллюсков, инвазированных на 100% метацеркариями, редиями и церкариями *E. echinatoides*;

4 группа — моллюски с «высокой» ИИ (ИИ от 18 тыс. до 165 тыс. экз/ос.). Сюда относили гепатопанкреас моллюсков, инвазированных на 97% спороцистами и церкариями трематод *Cercaria pugnax* La Valette и в незначительном количестве (до 3%) — другими видами трематод.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что содержание общего белка и активность СДГ в гепатопанкреасе моллюсков зависит от интенсивности трематодной инвазии (табл. 1). Так, при «низкой» ИИ моллюсков (2 группа) в гепатопанкреасе наблюдалось снижение содержания

1. Содержание общего белка (мг/г) и активность СДГ (нмоль/мг белка·15 мин) в гепатопанкреасе моллюсков при различной ИИ трематодами ($M \pm m$; $n = 5$; $p \geq 0,95$)

ИИ	Содержание общего белка	Активность СДГ
Контроль	176,91 ± 0,89	1,58 ± 0,10
«Низкая»	156,27 ± 0,78	1,86 ± 0,19
«Средняя»	133,83 ± 0,96	2,22 ± 0,19
«Высокая»	113,21 ± 0,99	2,80 ± 0,15

общего белка на 11,67% по сравнению с контролем (1 группа). С увеличением степени трематодной инвазии моллюсков в гепатопанкреасе (группы 3 и 4) усиливается снижение содержания общего белка по отношению к контролю. Наибольшее снижение этого показателя (на 36,01%) отмечено в гепатопанкреасе моллюсков при «высокой» степени трематодной инвазии. Этот факт свидетельствует о том, что трематодная инвазия моллюсков вызывает уменьшение синтеза белка в гепатопанкреасе, что в конечном итоге может привести к их гибели.

В отличие от белка, ИИ моллюсков трематодами повышала активность СДГ в гепатопанкреасе по сравнению с контролем. Следует отметить, что с возрастанием ИИ трематодами от «низкой» до «средней» и, особенно, «высокой» (группы 2, 3 и 4) активность этого фермента значительно возрастала — соответственно на 11,77; 40,51 и 77,21% относительно контроля. На основании таких изменений активности СДГ в гепатопанкреасе можно прийти к выводу, что ИИ моллюсков трематодами способствует превращению сукцината (янтарной кислоты) в фумарат (фумаровую кислоту).

Поскольку СДГ является ключевым ферментом цикла Кребса, то повышение активности исследуемого фермента в гепатопанкреасе зараженных моллюсков усиливает интенсивность данного цикла, что способствует генерированию энергии для процессов их адаптации к таким условиям.

Необходимо подчеркнуть, что иная картина изменений изучаемых показателей наблюдается в гепатопанкреасе инвазированных моллюсков при различной температуре водной среды (табл. 2). Повышение температуры водной среды устраняет негативное влияние трематодной инвазии моллюсков на уровень общего белка в гепатопанкреасе. Так, с возрастанием температуры воды от 21 до 26 и 30°C в гепатопанкреасе моллюсков с «низкой» ИИ содержание общего белка значительно возрастает (соответственно в 2,57 и 2,42 раза). В это же время в гепатопанкреасе моллюсков со «средней» ИИ уровень общего белка также возрос (соответственно на 119,98 и 42,81%) при повышении температуры водной среды от 21 до 26 и 30°C, однако в меньшей степени, чем при низкой ИИ.

Аналогичная картина изменений величины исследуемого показателя наблюдается в гепатопанкреасе моллюсков с «высокой» ИИ в диапазоне температур 21—30°C. При этом, количество общего белка в гепатопанкреасе

2. Содержание общего белка (мг/г) и активность СДГ (нмоль/мг белка·15 мин) в гепатопанкреасе инвазированных трематодами моллюсков при различной температуре водной среды ($M \pm m$; $n = 5$; $p \geq 0,95$)

Степень инвазии	Температура, ЕС	Содержание общего белка	Активность СДГ
«Низкая»	21	156,27 ± 0,27	1,89 ± 0,19
	26	401,56 ± 0,86	0,41 ± 0,29
	30	378,79 ± 0,97	2,47 ± 0,18
«Средняя»	21	133,83 ± 0,94	2,22 ± 0,29
	26	294,40 ± 0,29	0,35 ± 0,16
	30	191,13 ± 0,68	2,76 ± 0,29
«Высокая»	21	113,21 ± 0,81	2,80 ± 0,25
	26	221,50 ± 0,97	0,26 ± 0,18
	30	184,18 ± 0,89	1,58 ± 0,19

моллюсков с «высокой» степенью инвазии возрастало на 95,65% при температуре водной среды 26°C, а при температуре 30°C — на 62,69%.

Анализируя полученные результаты, можно заметить, что различная степень трематодной инвазии оказывает неодинаковое влияние на уровень общего белка в гепатопанкреасе при адаптации к диапазону температур среды 21—30°C. Самое большое количество общего белка обнаружено в гепатопанкреасе моллюсков при «низкой» ИИ в интервале температур среды 21—26°C. С увеличением ИИ моллюсков трематодами влияние температуры водной среды на содержание общего белка в гепатопанкреасе несколько снижается. Однако при температуре 26°C содержание общего белка в гепатопанкреасе моллюсков всех степеней трематодной инвазии было самым высоким. Это связано с тем, что эта температура является наиболее благоприятной для жизнедеятельности моллюсков. Отсюда следует, что такая температура водной среды способствует усилению биосинтеза белка в гепатопанкреасе моллюсков с различной ИИ трематодами. Об этом свидетельствуют полученные нами результаты исследований.

Что же касается СДГ, то ее активность в гепатопанкреасе моллюсков с «низкой», «средней» и «высокой» степенями трематодной инвазии снижалась с возрастанием температуры водной среды до 26°C соответственно на 77,96, 84,23 и 90,71 %. Таким образом, угнетение активности СДГ в гепатопанкреасе моллюсков при температуре водной среды 26°C зависит от степени их трематодной инвазии. На основании результатов исследований можно сделать вывод о том, что при таких условиях ингибируется реакция превращения сукцината в фумарат в гепатопанкреасе моллюсков. То есть тормозится функционирование цикла Кребса, что может привести, как показали некоторые авторы [15, 22, 25], к накоплению в тканях моллюсков сукцината, который в анаэробных условиях позволяет митохондриям сохранить метаболическую активность до обеспечения организма кислородом [8].

В то же время с повышением температуры водной среды до 30°C активность СДГ в гепатопанкреасе моллюсков с «низкой» и «средней» степенями трематодной инвазии значительно возрастает — соответственно на 32,79 и 24,32%. Отмеченный факт свидетельствует о том, что при таких условиях активируется реакция превращения сукцината в фумарат в гепатопанкреасе моллюсков и тем самым усиливается функционирование цикла Кребса.

Необходимо отметить, что в отличие от моллюсков с «низкой» и «средней» степенями трематодной инвазии, у особей с «высокой» ИИ с повышением температуры водной среды от 21 до 30°C активность этого фермента в гепатопанкреасе резко снижается (на 43,57%). На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что такие условия являются неблагоприятными для жизнедеятельности моллюсков.

В ходе эксперимента нами были отмечены изменения в поведении моллюсков при увеличении температуры, а именно: их способность изолироваться от экстремальных воздействий закрыванием крышечкой устья раковины. Отрицательное влияние паразитов на резистентность моллюсков связано, прежде всего, с нарушением способности зараженных моллюсков закрывать крышечкой устье раковины. На это указывает также повышенная скорость потери солей у зараженных гидробий по сравнению с незараженными экземплярами [1].

В ходе исследований показано увеличение содержания общего белка в гепатопанкреасе моллюсков при повышении температуры среды во всех группах заражения по сравнению с контролем, оно было наиболее выраженным во второй группе инвазии («низкая» ИИ), для которой характерны метацеркарии трематод *E. echinatoides* и *L. constantinae*. Анализ литературных данных показал, что хотя метацеркарии не питаются, они все же влияют на организм моллюска. Метацеркарии особенно патогенны в момент их внедрения в ткани хозяина и в процессе миграции [2]. Патогенность инцистированных паразитов в значительной степени зависит от их локализации в организме хозяина. Метацеркарии как *E. echinatoides*, так и *L. constantinae* нами и другими исследователями были обнаружены в гепатопанкреасе моллюсков *V. viviparus* [17].

Известно, что в процессе миграции паразиты могут вызывать тяжелые поражения и даже гибель хозяина. Например, быстро погибают головастики в результате внедрения в их ткани большого числа эхиностоматидных церкарий. Последнее, возможно, обусловлено наличием в секрете желез проникновения паразитов таких веществ, как гиалуронидаза и гистамин, вызывающих многочисленные внутренние кровоизлияния [2]. Учеными были исследованы метацеркарии *L. constantinae*, выращенные на 6—15-дневных куриных эмбрионах. Было показано гипертрофирование эктодермы хориона в зоне, близко к которой находилась метацеркария [19, 20]. Также изучена активность и локализация гидролитических ферментов на неинцистированных (свободных) метацеркарий *L. constantinae* [23]. Эти ферменты необходимы для проникновения личинок и миграции к месту локализации в теле моллюска. Влияние метацеркарий *L. constantinae* до конца не исследовано, хотя имеются данные о воздействии паразита на плодови-

тость пресноводных моллюсков *Campeloma decisum* [21]. Нами данный факт не был подтвержден по причине иной локализации метацеркарий в моллюсках *V. viviparus*. По нашему мнению, максимальное увеличение содержания общего белка во второй группе с «низкой» ИИ может быть компенсаторной реакцией организма хозяина на влияние метацеркарий трематод и следствием ускоренного метаболизма в результате повышения температуры.

К незначительным колебаниям температуры и паразитарному фактору моллюски в процессе эволюции выработали механизмы адаптации, но как показали наши исследования, средний и высокий уровни инвазии приводят к ослаблению защитных функций организма хозяина и невозможности поддерживать гомеостаз внутри системы. Его реакция будет еще более неоднозначной, учитывая влияние повышенной температуры. Так, полученные нами результаты, а также анализ литературных источников свидетельствуют об обратной пропорциональной зависимости содержания общего белка в тканях моллюсков от величины ИИ. Белок тканей водных организмов, в отличие от углеводов и жиров, является наиболее стабильным веществом их тела. Уменьшение его содержания приводит к снижению общей резистентности организма и способствует развитию заболеваний про- и эукариотического происхождения [4, 9]. На фоне глобального потепления остается актуальным вопрос изменения величины этого показателя под влиянием температуры. Так, наши исследования показали, что при воздействии повышенной температуры (26°C) и «высокой» инвазии, а при 30°C — и в группе со «средней» ИИ, отмечалось более высокое содержание общего белка в гепатопанкреасе моллюсков.

Поскольку моллюски, как хозяева партенитов, сами находятся в сильной зависимости от температуры, то и партениты в значительной степени подвержены воздействиям со стороны среды второго порядка (внешние условия) [18]. Пределы колебания температуры, оптимальные для хозяина, обычно являются оптимальными и для паразита. Несовпадение температурных адаптаций чаще всего наблюдается при значительных отклонениях от оптимума в ту или иную сторону. В результате воздействия паразитов может изменяться интенсивность обмена веществ хозяина. Моллюски, подобно другим экзотермным организмам, отдают во внешнюю среду тепло, которое образуется в процессе их жизнедеятельности. Одновременно с теплоотдачей у зараженных моллюсков снижается поглощение минерального фосфора и наблюдается тенденция к повышенному потреблению кислорода, в результате чего усиливается интенсивность обмена веществ [2, 13].

В ходе наших экспериментов обнаружено, что с ростом температуры активность фермента СДГ увеличивается, однако после того, как температура превышает оптимальную величину, тепловое ингибирование начинает преобладать над активацией. Кроме того, повышение ИИ партенитами трематод, которые питаются за счет организма хозяина, также приводит к увеличению интенсивности обмена веществ. Наши исследования показали, что при «средней» ИИ трематодами (до 11,5 тыс. экз/ос.) и в условиях повышенной температуры активность СДГ выше по сравнению с контролем и другими вариантами температурного режима, что свидетельствует об усилении

интенсивности преобразования сукцинату в фумарат. Суммарное же воздействие повышенной температуры и «высокой» ИИ трематодами *S. pugnax* (до 165 тыс. экз/ос.) приводит к истощению организма хозяина: отрицательно влияет на активность СДГ, в результате чего происходит ингибирование процесса преобразования сукцинату в фумарат, то есть при этом нарушается нормальное функционирование цикла Кребса.

Заклучение

Установлено, что содержания общего белка в гепатопанкреасе моллюсков *V. viviparus* уменьшается с возрастанием интенсивности заражения паразитами. Максимальное содержание общего белка, которое наблюдается при «низкой» степени инвазии и 26°C, может быть компенсаторной реакцией организма хозяина на влияние метацеркарий трематод и следствием ускоренного метаболизма в результате повышенной температуры. Сочетанное влияние «высокой» ИИ при 26°C, а также «средней» и «высокой» ИИ при 30°C положительно влияет на уровень общего белка в гепатопанкреасе моллюсков.

Влияние температуры, а также инвазии партенитами трематод приводит к возрастанию ферментативной активности в гепатопанкреасе моллюсков. Совместное влияние повышенной (30°C) температуры и «высокой» степени инвазии трематодами *S. pugnax* (до 165 тыс. экз/ос.) ингибирует активность СДГ.

**

Встановлено залежність між вмістом загального білка, активністю СДГ в гепатопанкреасі та інтенсивністю трематодної інвазії моллюсків за різної температури водного середовища. Показано, що з підвищенням трематодної інвазії моллюсків у гепатопанкреасі знижується кількість загального білка (на 11,67—36,01%) і зростає активність СДГ (на 11,77—77,21%) порівняно з контролем. З підвищенням температури водного середовища з 21 до 30°C в гепатопанкреасі інвазованих моллюсків збільшується вміст загального білка. Найбільше підвищення рівня цього показника було в гепатопанкреасі інвазованих моллюсків при температурі 26°C. Активність СДГ в гепатопанкреасі високозаражених моллюсків знижувалася зі збільшенням температури води з 21 до 30°C.

**

*The separate and combined influence of parasite infection and the different temperatures on total protein and succinate dehydrogenase activity in tissues of snails *V. viviparus* were researched. Inversely decrease of total protein in the hepatopancreas of snails *V. viviparus* on the influence of trematode invasion was investigated. While the effect of water temperature and the trematode infections led to an increase in enzyme activity in the snails. Combined effect of high (30°C) temperature and high intensity of invasion of *S. pugnax* (up to 165 thousand partenites/snail) inhibited the activity of SDG.*

**

1. Галактионов К.В., Бергер В.Я., Прокофьев В.В. Сравнение устойчивости к факторам внешней среды моллюсков *hydrobia ulvae*, зараженных партенитами трематод и свободных от инвазии // Паразитология. — 2002. — Т. 36, № 3. — С. 195—202.

2. Гинецинская Т.А. Трематоды, их жизненные циклы, биология, эволюция. — Л.: Наука, 1968. — 410 с.
3. Грубинко В.В. Физиолого-биохимические критерии токсичности среды для рыб // Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології: Матеріали VI Міжнарод. іхтіол. наук.-практ. конф. — Тернопіль: Вектор, 2013. — С. 70—75.
4. Давыдов О.Н., Неборачек С.И., Куровская Л.Я., Лысенко В.Н. Экология паразитов рыб водоемов Украины. — Киев, 2011. — 492 с.
5. Иванов А.В., Полянский Ю.А. Большой практикум по зоологии беспозвоночных. — М.: Высш. шк., 1981. — 504 с.
6. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учеб. пособие / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 272 с.
7. Досон Р., Эллиот Д. Справочник биохимика. — М.: Мир, 1991. — 543 с.
8. Кондрашова М.Н. Накопление и использование янтарной кислоты в митохондриях. Митохондрии. — М.: Наука, 1972. — С. 151—169.
9. Куровская Л.Я. Адаптационные изменения физиолого-биохимических параметров сеголеток карпа при эктопаразитарных инвазиях // Второй Симпозиум по экол. биохимии рыб: Тез. докл. — Ярославль, 1990. — С. 144—146.
10. Панин Л.Е. Энергетические аспекты адаптации. — Л.: Медицина, 1978. — 192 с.
11. Панин Л.Е., Маянский Д.Н. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск: Наука, 1983. — 230 с.
12. Определение активности сукцинатдегидрогеназы // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 44.
13. Проссер Л. Кислород, дыхание и метаболизм // Сравнительная физиология животных. — М., 1977. — Т. 1. — С. 349—421.
14. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. — Л.: Наука, 1981. — 135 с.
15. Хочачка П. Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.
16. Хундерякова Н.В., Захарченко М.В., Захарченко А.В. Приближение к исследованию сигнального действия янтарной кислоты на митохондрии в условиях цитобиохимического метода // Биологические мембраны. — 2012. — 29 (6). — С. 442—453.
17. Черногоренко М.И. Личинки трематод в моллюсках Днепра и его водохранилищ. — Киев: Наук. думка, 1983. — 410 с.
18. Юнчис О.Н. Возможные изменения паразитофауны рыб при глобальном потеплении // Проблемы ихтиопатологии в начале XXI века: Тр. Гос-НИОРХ, 2009. — Вып. 338. — С. 240—246.
19. Fishbein J.M., Fried B., Stableford L.T. Histopathology of chick extra-embryonic membranes experimentally infected by *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda) // Trans. Amer. Microsc. Soc. — 1985. — Vol. 104, N 3. — P. 267—271.

20. *Fried B., Mishkind S.H.* Scanning electron microscopy of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda) from the chick chorioallantois and bursa of fabricius // *Ibid.* — 1985. — Vol. 104, N 1. — P. 100—103.
21. *Johnson S.G.* Parasite-induced parthenogenesis in freshwater snail: stable, persistent patterns of parasitism // *Oecologia.* — 1992. — N 89. — P. 533—541.
22. *Lama J.L., Bell R.A., Storey K.B.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation in the hepatopancreas of the anoxia-tolerant marine mollusc, *Littorina littorea* // *PeerJ.* — 2013. — doi:10.7717/peerj.21.
23. *LeFlore W.B., Fried B., Bass H.S.* Histochemical localization of hydrolytic enzymes in metacercariae and young adults of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda) // *Trans. Amer. Microsc. Soc.* — 1987. — Vol. 106, N 1. — P. 74—79.
24. *Pinheiro J., Maldonado A.J., Attias M., Lanfredi R.M.* Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda) // *Parasitol. Res.* — 2004. — Vol. 93, N 3. — P. 171—177.
25. *Pleše B.* Anaerobic pathways in the Porifera: Strombine dehydrogenase, an opine dehydrogenase, from the sponge *Suberites domuncula*: Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften. — Mainz, 2007. — 127 p.
26. *Portner H.O., Grieshaber M.K., Heisler N.* Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: effect of environmental hypoxia on extracellular and intracellular pH in *Sipunculus nudus* L. // *J. Comp. Physiol. B.* — 1984. — Vol. 155. — P. 13—20.