

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ У БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ ВИДА *PLANORBIS CORNEUS*

© 2002 Т.Н. Картавых, В.Г. Подковкин¹

В статье рассмотрены особенности воздействия повышенной температуры как абиотического фактора окружающей среды на аквариумную улитку в качестве лабораторной модели. Полученные результаты возможно экстраполировать на реальную ситуацию в живой природе, поскольку искусственный подогрев водоемов в настоящее время достаточно широко распространен. Также экспериментально определены параметры инкубационной смеси для данного объекта.

Введение

В настоящее время все большее значение приобретает исследование процессов воздействия различных факторов окружающей среды на живой организм и адаптации организма к этим факторам. Температура окружающей среды — один из ведущих абиотических факторов, воздействующих на обитателей биосферы. На сегодняшний день доказано ее влияние на интенсивность обмена, скорость роста, темп эмбрионального и постэмбрионального развития. От температуры окружающей среды зависит географическое расселение организмов на планете. Поэтому биологические адаптации к остальным факторам могут осуществляться непременно на базе предварительной адаптированности животного к температуре. Чрезвычайно актуальны в настоящее время исследования малакофауны естественных и антропогенных ландшафтов. Моллюски являются важным компонентом любого водного биогеоценоза. Воздействию повышенной температуры они могут подвергаться, например, на мелководье в жаркий день. Или это может быть антропогенное влияние, когда водоем используется для охлаждения каких-либо промышленных объектов [5]. От этого могут зависеть реакции моллюсков на другие факторы среды.

Для подобных исследований вполне подходящим объектом является аквариумная улитка *Planorbis corneus* как лабораторная модель.

Для обеспечения запуска адаптивных биохимических реакций организм должен обладать способностью реагировать должным образом на соответствующие раздражители [4]. Интересна в этом отношении холинэстеразная система, поскольку ее функционирование связано с проведением импульса через синапс [3, 6]. Следовательно, по ее состоянию можно судить о реактивности нервной системы, которая играет

¹ Картавых Татьяна Николаевна (artemisiam@pisem.net), Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, г.Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

определяющую роль в адаптационном процессе. В связи с этим актуально исследование процесса адаптации данной ферментативной системы к температуре.

Материал и методы исследования

Объектом исследования являлась аквариумная улитка *Planorbis corneus*.

Исследовались пять возрастных групп улиток массой от 10 до 700 мг: 1-я — животные массой менее 100 мг, 2-я — от 100 до 200 мг, 3-я — от 200 до 300 мг, 4-я — от 300 до 400 мг, 5-я — более 400 мг. На предмет однородности популяции по холинэстеразной активности изучались две группы животных: коричневые улитки (пигментированные) и красные (альбиносы).

Определение холинэстеразной (ХЭ) активности осуществляли по методу Хестрина [1] для плазмы крови в нашей адаптации для улиток.

Также проводилось количественное определение содержания белков в исследуемом материале с целью пересчета активности фермента на миллиграмм белка. Определение белков производили микробиуретовым методом [2].

Для определения оптимума рН ХЭ улиток готовили серию буферных растворов со значениями рН от 6 до 9 через 0,5 и проводили исследование по методике.

Для определения оптимума температуры инкубацию фермента и субстрата проводили при различных температурах, от 2 до 60°C с интервалом в 5°C.

Температурному воздействию улиток подвергали, помещая отдельные партии животных в термостат при 35, 37, 40°C на 10, 30, 60 мин для каждой температуры. Контролем служили животные, отловленные в то же время, что и опытные, но не подвергаемые температурному воздействию ($t_{\text{комн.}} = 20\text{--}25^\circ\text{C}$).

Результаты исследований и их обсуждение

Активность ХЭ сравнивали у животных пяти возрастных групп. Статистически значимое увеличение изучаемого показателя наблюдалось у животных массой больше 400 мг. Различия между остальными группами недостоверны (табл. 1). Результаты изучения возрастных изменений активности фермента можно использо-

Таблица 1
Возрастные изменения холинэстеразной активности у моллюсков

Диапазон массы животных, мг	Количество животных в группе	Активность ХЭ (А, $\times 10^{-2}$ мкмоль/мгбелка \times мин)
< 100	8	8,45 \pm 0,49
100 – 200	14	7,96 \pm 0,62
200 – 300	14	8,24 \pm 0,44
300 – 400	8	7,31 \pm 0,58
> 400	3	11,20 \pm 1,30*

Примечание. * — отличие от контроля статистически достоверно.

вать при отборе животных для дальнейших исследований. Логично предположить, что для сохранения чистоты эксперимента нецелесообразно исследование улиток массой свыше 400 мг, у которых повышена холинэстеразная активность. Мелких животных (массой менее 100 мг) брать в эксперимент не совсем удобно, поскольку они дают мало материала. Таким образом, оптимальным представляется исследование животных среднего возраста (массой 100–400 мг).

Данные, полученные при исследовании холинэстеразной активности у коричневых улиток (т.е. особей с нормальной пигментацией) и альбиносов, свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий (табл. 2). В связи с этим можно

Таблица 2

Однородность популяции моллюсков по холинэстеразной активности

Пигментация животных	Количество животных в группе	Активность ХЭ (A , $\times 10^{-2}$ мкмоль/мг белка \times мин)
Коричневые	9	8,52 \pm 0,40
Альбиносы	14	7,86 \pm 0,40

предположить, что и коричневые, и красные аквариумные улитки одинаково пригодны для изучения холинэстеразной активности у них в дальнейшем. Исследования не выявили связи между пигментацией животных и активностью фермента.

Данные, полученные при исследовании оптимума рН для холинэстеразной активности улиток (табл. 3), свидетельствуют о том, что распределение значений рН соответствует общеизвестному и имеет колоколообразную форму. Оптимум рН для фермента находится в пределах от 7,5 до 9; этому интервалу соответствуют максимальные значения активности фермента. Минимальное значение изучаемого показателя отмечено при рН=6, максимальное — при рН=7,8.

Таблица 3

Зависимость холинэстеразной активности моллюсков от рН среды инкубации

рН среды	6,0	6,5	7,0	7,5
Активность ХЭ (A , $\times 10^{-2}$ мкмоль/мг белка \times мин)	3,36 \pm 0,29	4,46 \pm 0,97	5,57 \pm 0,57	6,01 \pm 0,71
рН среды	7,8	8,0	8,5	9,0
Активность ХЭ (A , $\times 10^{-2}$ мкмоль/мг белка \times мин)	6,38 \pm 0,98	5,96 \pm 0,46	6,53 \pm 0,77	6,18 \pm 0,78

В ходе определения оптимума температуры среды инкубации для ХЭ улиток (табл. 4) выявлено, что распределение значений изучаемого показателя так же, как и для рН, имеет колоколообразную форму. Максимальное значение активности фермента отмечено при 40°C, минимальное при 2–5°C и при 60°C. Оптимум температуры для изучаемого показателя находится в пределах от 25 до 45°C. ХЭ улиток имеет высокую активность в достаточно широком диапазоне температур, вероятно,

Таблица 4

Зависимость холинэстеразной активности моллюсков
от температуры среды инкубации

t среды, °C	2	5	10	15	20	25	30
Активность ХЭ ($A \times 10^{-2}$ <i>мкмоль/мгбелка</i> × мин)	1,90 ± 0,06	1,98 ± 0,13	3,83 ± 1,30	4,17 ± 1,30	3,70 ± 0,62	6,16 ± 0,58	5,41 ± 0,88
t среды, °C	35	40	45	50	55	60	
Активность ХЭ ($A, \times 10^{-2}$ <i>мкмоль/мгбелка</i> × мин)	6,10 ± 0,73	7,05 ± 2,06	6,00 ± 0,99	4,90 ± 1,34	2,69 ± 0,31	1,83 ± 1,16	

потому, что улитка — животное холоднокровное, и температура внутренней среды ее организма изменяется в близком соответствии с температурой окружающей среды.

Результаты исследования оптимума рН и температуры были использованы нами при подборе методики определения активности фермента у улиток, поскольку в доступной литературе не содержалось описания эксперимента с подобным объектом. Мы сочли целесообразным проводить инкубацию фермента при условиях, определенных в методе Хестрина [1], в связи с тем, что эти значения входят в диапазон оптимальных для ХЭ улиток.

Далее исследовалось влияние повышенной температуры окружающей среды на холинэстеразную активность у моллюсков (табл. 5).

Таблица 5

Изменение холинэстеразной активности при воздействии на моллюсков
повышенной температуры окружающей среды

Время воздействия, мин	Активность ХЭ ($A, \times 10^{-2}$ <i>мкмоль/мгбелка</i> × мин); температура <i>t</i>		
	35°С	37°С	40°С
10	6,09 ± 0,29*	6,39 ± 0,63	7,13 ± 0,21
30	8,23 ± 0,39*	8,08 ± 0,37*	7,73 ± 0,32
60	6,60 ± 0,17*	6,68 ± 0,24	7,51 ± 0,44
Контроль	7,31 ± 0,33		

Примечание. * — отличие от контроля статистически достоверно.

При воздействии температуры 35°С получены следующие данные. После 10-минутной экспозиции активность фермента достоверно снижалась по сравнению с контролем, после 30-минутного воздействия следовало повышение показателя, а после 60-минутного активность фермента снова понижалась.

Изменение холинэстеразной активности при воздействии на моллюсков температуры 37°C было следующим. Снижение показателя после 10-минутного воздействия было статистически недостоверно. 30-минутное воздействие вызвало достоверное увеличение холинэстеразной активности ($p < 0,05$), а после 60-минутной экспозиции исследуемый показатель незначительно понизился.

При повышении температуры окружающей среды до 40°C также прослеживалась указанная тенденция, но изменения активности фермента были статистически недостоверны.

Нами была сделана попытка объяснить полученные результаты с позиций теории трех фаз в реакциях организма на возрастающий стимул [8]. При 35°C в первые 10 мин экспозиции наблюдалось снижение активности фермента, вероятно, вследствие того, что для организма это было слишком слабое воздействие, отвечать на которое нецелесообразно. Продолжение воздействия до 30 мин, возможно, было для организма фактором средней силы и вызывало активизацию всех регуляторных систем, в том числе и ферментативных, поскольку холинэстеразная активность у улиток увеличивалась. После 60-минутного нагревания исследуемый показатель снизился по сравнению с контролем, что, скорее всего, свидетельствует об адаптации к указанному фактору. В литературных источниках также отмечается, что при повышении температуры окружающей среды уровень физиологических процессов у моллюсков снижается, в частности, при искусственном обогреве водоемов, как в случае с водоемом-охладителем ТЭС [3, 5, 7]. При воздействии 37°C наблюдалась сходная картина, но данные по 10-ти и 60-минутной экспозиции отличались от контроля недостоверно. При воздействии 40°C не наблюдалось изменений холинэстеразной активности. Можно предположить, что это было уже достаточно сильное воздействие и такая ареактивность наблюдалась вследствие развития охранительного торможения в ЦНС. Если бы реакция организма была пропорциональна силе воздействия, только она сама по себе была бы губительна для животного [8].

Заключение

Таким образом, изучение холинэстеразной активности у брюхоногих моллюсков показало, что:

- 1) у брюхоногих моллюсков существует возрастная динамика холинэстеразной активности. Данный показатель увеличен у животных массой более 400 мг;
- 2) холинэстеразная активность не различается у животных с различной пигментацией;
- 3) оптимум рН холинэстеразной активности у брюхоногих моллюсков находится в пределах от 7,5 до 9;
- 4) оптимум температуры среды инкубации для холинэстеразной активности у брюхоногих моллюсков находится в пределах от 25 до 45°C ;
- 5) воздействие повышенной температуры окружающей среды (35°C) вызывает уменьшение холинэстеразной активности у брюхоногих моллюсков через 10 минут после начала экспозиции. Через 30 минут происходит увеличение исследуемого показателя по сравнению с контролем. Через 60 минут активность фермента возвращается к уровню десятиминутного воздействия;
- 6) воздействие температуры 37°C вызывает увеличение холинэстеразной активности у брюхоногих моллюсков через 30 минут после начала экспозиции. Через 60 минут исследуемый показатель возвращается к контрольному уровню;
- 7) воздействие температуры 40°C не оказывает существенного влияния на холинэстеразную активность у брюхоногих моллюсков.

Литература

- [1] Биохимические и иммунологические методы оценки регулирующих систем организма. Куйбышев: Изд-во мед. института, 1989. 31 с.
- [2] Большой спецпрактикум по биохимии/ Сост. Н.А. Кленова. Самара: Изд-во Самарского гос. университета, 1996. 87с.
- [3] Вараксин А.А. Строение и гистофизиология ЦНС приморского гребешка и дальневосточной гигантской мидии/ В кн.: Моллюски. Их система, эволюция и роль в природе. Л.: Наука, 1975. С. 148–149.
- [4] Кашин А.Г. Влияние солености среды обитания на состав липидов некоторых водных беспозвоночных: Автореф. дис... канд. биол. наук. Самара: Изд-во Самарского гос. университета, 1997. 23 с.
- [5] Кितिцына Л.А. Влияние температурного режима водоема — охладителя ТЭС на интенсивность обмена и размеры моллюска *Valvata piscinalis*/ В кн.: Моллюски. Пути, методы и итоги их изучения. Л.: Наука, 1971. С. 92–94.
- [6] Магазаник Л.Г. Функциональная организация холинорецептивных постсинаптических мембран/ В кн.: Структура и функции биологических мембран. М.: Наука, 1975. С. 240–265.
- [7] Сергеева Э.П. Теплоустойчивость целого организма гастроподы *Asmaea pallida* и ее комменсала *Arctonoe vittata*/ В кн.: Моллюски. Пути, методы и итоги их изучения. Л.: Наука, 1971. С. 126–129.
- [8] Симонов П.В. Три фазы в реакциях организма на возрастающий стимул. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 244 с.

INFLUENCE OF HIGH TEMPERATURE OF ENVIRONMENT UPON CHOLINESTERASE ACTIVITY IN GASTROPODA PLANORBIS CORNEUS

© 2002 T.N. Kartavykh, V.G. Podkovkin²

Features of the influence of higher temperature as an abiotic environmental factor upon an aquarium mollusk as the laboratory model are examined in the article. Data obtained may be transferred into real conditions in living nature because artificial heating is rather widespread nowadays. Also parameters of incubative mix for this object were defined.

Поступила в редакцию 29/III/2002;
в окончательном варианте — 29/V/2002.

²Kartavykh Tatjana Nikolaevna (artemisiam@pisem.net), Podkovkin Vladimir Georgievich (podkovkin@rambler.ru), Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.