



УДК 598.115.31+577.12

## Біохімічні показники крові звичайного вужа (*Natrix natrix*) з екосистем із різним ступенем антропогенного навантаження

В.Я. Гасо, А.Н. Гагут, С.В. Єрмоленко

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна*

Установлено значення для 11 біохімічних параметрів сироватки крові популяції звичайного вужа з різних за ступенем техногенного навантаження екосистем. Дослідження проведені для популяції звичайного вужа заплавної екосистем правого берега р. Дніпро (у межах м. Дніпропетровськ), які представлені системою озер і островів. Ці екосистеми перебувають під впливом розташованих вище за течією промислових підприємств Дніпропетровська та Дніпродзержинська. Зважаючи на це, ми розглядаємо згадані екосистеми як антропогенно трансформовані. Як контроль обрано прибережні біотопи лівого берега р. Самара (Новомосковський р-н, Дніпропетровська обл.). Статистично значимі відмінності виявлені для білкового складу крові вужів, ферментативної активності та показників загального обміну речовин. У вужів, які живуть в антропогенно трансформованих екосистемах міста, зменшується вміст альбуміну в сироватці крові. Це відбувається на фоні незмінної концентрації загального білка та глобулінів, спричиняє відповідне зниження білкового коефіцієнта. У звичайних вужів трансформованих ділянок підвищується активність аланінамінотрансферази, але не змінюється активність аспаргатамінотрансферази порівняно зі зміями контрольних ділянок. Все це зумовлює зниження індексу де Рітиса, що може відбивати певні патологічні зміни у печінці вужів. Підвищується також активність лужної фосфатази сироватки крові вужів із Дніпропетровська, що вказує на певні зміни фізіологічного стану печінки вужів, вилучених на урбанізованих територіях. Наведені результати можна використати в майбутніх дослідженнях як контрольні показники для встановлення стану організму звичайних вужів за техногенного впливу.

*Ключові слова:* сироватка крові; змії; техногенний вплив; Дніпропетровська область

## Biochemical parameters in the blood of grass snakes (*Natrix natrix*) in ecosystems under varying degrees of anthropogenic influence

V.Y. Gasso, A.M. Nahut, S.V. Yermolenko

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine*

The grass snake *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) is a partly hygrophilous species, distributed throughout Ukraine. This snake may be considered as a test object for environmental biomonitoring. Modern biochemical methods make it possible to obtain new scientific data on the effects of anthropogenic pressure on reptiles. Blood is a sensitive and informative indicator of the condition of an organism as it responds quickly to most changes in exogenous and endogenous factors, and reflects negative influences on both individual and, indirectly, populations. Changes in biochemical parameters may be used as biomarkers of the state of health of reptiles in ecosystems under varying degrees of anthropogenic pressure. Due the increase in anthropogenic influence the development and introduction of new methods of perceptual research, collection of up-to-date information and development of a database of reptile biochemical parameters have become an urgent priority. We collected mature individuals of the grass snake in floodplain ecosystems on the right bank of the Dnieper River in Dnipropetrovsk city. Grass snakes from floodplain habitats on the left bank of the Samara River (O.L. Belgard Prysamarskii International Biosphere Station, Novomoskovsk district, Dnipropetrovsk province) were studied as the control specimens. Our study demonstrated statistically significant differences between snakes from the study sites in the amount of albumin, urea and urea nitrogen, and inorganic phosphorus, as well as in alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) activity. The amount of albumin in the blood serum of specimens from the

anthropogenically transformed areas was significantly lower (by 25%) than in that of the snakes caught in the control habitats. Decrease of the albumin concentration usually indicates abnormal processes in the kidneys and liver. According to the changes observed in the concentration of albumin, a corresponding increase in the albumin to globulin ratio by about 30% was found. A statistically significant increase in alkaline phosphatase activity may demonstrate negative physiological changes in tissues of the liver and bones. Increased activities of ALT and AP indicate certain changes in the physiological condition of the liver of snakes from the anthropogenically transformed site. Other studied parameters did not exceed the limits found for different species of reptiles. Significant differences between certain biochemical parameters in the serum of snakes from the studied regions may reflect pathological processes in the grass snakes from transformed ecosystems, mainly in their liver and kidneys. The results can be used in future studies as benchmarks for assessing the condition of the organism of this species in the conditions of anthropogenic stress.

*Keywords:* blood serum; technogenic influence; snakes; Dnipropetrovsk region

## Вступ

Вуж звичайний *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) – один із найпоширеніших видів змій Євразії та Північної Африки (Ananjeva et al., 2006), поширений і на всій території України (Gasso, 2011). Оскільки цей вид зустрічається майже в усіх типах водойм та їх прибережних екосистемах, а особини характеризуються незначними добовими міграціями, звичайного вужа можна використовувати як тест-об'єкт для біомоніторингу навколишнього середовища (Knotkova, 2002). Біохімічні методи дослідження крові дозволяють отримати суттєві дані щодо впливу забруднення довкілля на тварин (Zakharov and Clark, 1993).

Кров являє собою чутливий та інформативний індикатор стану організму, що швидко реагує на зміни екзогенних та ендогенних факторів та відображає вплив на особину і, опосередковано, на популяцію в цілому. Біохімічні показники можна використовувати як маркери стану організму рептилій в екосистемах, різних за ступенем антропогенного навантаження (Pages et al., 1992; Raphael et al., 1994; Lopez-Olvera et al., 2003). У комплексі біохімічні параметри крові можуть характеризувати кількість та якість живлення, адаптивні можливості змій та інтенсивність дії на них антропогенних факторів. У зв'язку з наростаючим антропогенним навантаженням на природні екосистеми, незважаючи на певний прогрес у збереженні природи (Pakhomov and Brygadyrenko, 2005) зростає актуальність розроблення та введення у практику високочутливих методів досліджень і створення бази даних біохімічних показників рептилій.

Загальний білок – сумарна концентрація альбуміну та глобуліну, що міститься в сироватці крові. З усіх білків у найбільшій концентрації в плазмі присутній альбумін, який синтезується у печінці. Він необхідний для підтримання осмотичної рівноваги між кровоносним руслом і навколосудинним простором. Певне діагностичне значення має білковий коефіцієнт – відношення кількості альбумінів до кількості глобулінів. Слід мати на увазі, що білковий коефіцієнт для холоднокровних тварин значно нижчий, ніж для теплокровних, що пояснюється еволюційно-екологічними особливостями білкового складу крові (Higgins, 2008).

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) – фермент печінки, що бере участь в обміні амінокислот. Вивільнення АЛТ у кров відбувається під час порушення внутрішньої структури гепатоцитів та підвищення проникності мембран. У зв'язку із цим АЛТ вважають індикаторним ферментом (маркером) порушень функціонування печінки різноманітної природи. В обміні амінокислот також бере участь аспартатамінотрансфераза (АСТ).

Збільшення її концентрації в сироватці крові вказує на ураження кардіоміоцитів. Тому за впливу некардіотропних екоотоксикантів у помірних концентраціях цей показник у тварин змінюється не так сильно, як АЛТ (Kamyshnikov, 2004).

Зміни кількості глюкози в крові рептилій зазвичай неспецифічні. Отже, цей показник слід розглядати у комплексі з іншими характеристиками крові. Азот сечовини в крові – це азот у кінцевих продуктах обміну білка, у першу чергу сечовини. Крім сечовини небілковий азот походить також із креатиніну, сечової кислоти та інших сполук. Комплекс цих показників може відображати стан нирок у тварин.

Більшість кальцію в організмі рептилій міститься в кістках. Рівень кальцію в крові тримається у достатньо вузькому діапазоні. Однак у період репродуктивної активності рівень кальцію може підвищуватися удвічі – утричі. Метаболізм фосфору та його рівень у крові тісно пов'язаний з кількістю кальцію. При цьому фосфор може бути єдиним показником негативних змін у нирках (Tosunoglu, 2011).

Зважаючи на те, що концентрація білкових фракцій у крові є динамічним показником, значення якого залежить від багатьох факторів, необхідні додаткові дослідження впливу промислового забруднення на білковий обмін змій, зокрема, звичайного вужа, в умовах Дніпропетровщини.

## Матеріал і методи досліджень

Досліджували статевозрілих особин вужа звичайного (20 екз.) у липні 2014–2015 років. У межах м. Дніпропетровськ дослідження проводили в заплавах екосистем правого берега р. Дніпро, представлених системою озер і островів (найбільший із них – о-в Болгарський), що прилягають до вулиці Набережна Заводська (48.487942° N 34.901590° E). Ці екосистеми перебувають під впливом розташованих вище за течією промислових підприємств Дніпропетровська та Дніпродзержинська. Як контроль обрано біотопи лівого берега р. Самара (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар імені О.Л. Бельгарда (Новомосковський район, Дніпропетровська область) (48.760984° N 35.435618° E).

Дослідження проводили відповідно до «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей». Перед отриманням біологічного матеріалу застосовували знеболівальний наркоз.

Отримані проби крові центрифугували для відділення формених елементів від плазми. Проводили визначення таких параметрів сироватки крові: загальний білок,

альбуміни, глобуліни, сечовина, азот сечовини, активність аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази та лужної фосфатази, вміст глюкози, загального кальцію та неорганічного фосфору. Білковий коефіцієнт розраховували як співвідношення альбумінової та глобулінової фракцій у сироватці крові.

Коефіцієнт де Рітиса визначали як відношення активностей аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази. Біохімію сироватки крові досліджували за стандартними методиками із триразовою повторністю (Kolb and Kamyshnikov, 1976) на базі НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики для малих вибірок. Біохімічні показники наведені у вигляді середнього ( $\bar{x}$ ), середньоквадратичного відхилення (SD). Достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням U-критерію Мана – Уїтні ( $P < 0,05$ ).

### Результати та їх обговорення

Загальна кількість білка крові змії, виловлених із біотопів, які перебувають під впливом техногенного навантаження, еквівалентна кількості білку крові вужів з умовно чистого регіону. Відмінності не спостерігаються і для кількості альбумінової та глобулінової фракцій (табл. 1). Разом із тим білковий коефіцієнт сироватки крові особин з урбанізованої території достовірно знижується на 30% порівняно зі зміями, виловленими в контрольних біотопах.

Таблиця 1

#### Вміст білка ( $\bar{x} \pm SD$ ) у сироватці крові вужа звичайного з екосистем Придніпров'я з різним ступенем антропогенної трансформації

Показник	р. Самара, n = 11	р. Дніпро, n = 9
Загальний білок, г/л	46,1 ± 9,4	46,6 ± 3,8
Альбумін, г/л	18,4 ± 2,0	21,3 ± 1,2
Глобулін, г/л	29,5 ± 4,9	26,1 ± 2,5
Білковий коефіцієнт, од.	0,59 ± 0,08	0,82 ± 0,04*

Примітка: \* –  $P < 0,05$ .

Кількість альбумінів і глобулінів сироватки крові змії варіює та залежить від багатьох факторів (Samour et al., 1998; Wang et al., 1999; Dickinson et al., 2002; Peterson, 2002), а отримані результати відповідають наведеним діапазонам значень даного показника для інших видів рептилій (Lisičić et al., 2013; Stepanenko, 2013).

Активність аланінамінотрансферази у сироватці крові вужів із забрудненого регіону підвищується майже на 76% порівняно з контрольними показниками, що цілком може свідчити про порушення активності печінки та інші патологічні процеси (табл. 2).

Активність АСТ у сироватці крові також збільшується у змії із зони, що піддається антропогенному навантаженню. Цей показник перевищує значення, відомі для рептилій (Vasilev, 2002, 2006; Stepanenko, 2013). Активність АСТ являє собою чутливий показник, який змінюється у випадку некрозу м'язів, патології печінки, а також зазвичай підвищується за ураження нирок. Виявлене підвищення цього показника для обох регіонів, що

досліджували, може також свідчити про паразитарні захворювання. Ріст активності трансаміназ виявлений раніше також у прудкої ящірки в умовах промислового забруднення екосистем (Klyumenko and Gasso, 2009).

Таблиця 2

#### Активність АЛТ та АСТ ( $\bar{x} \pm SD$ ) у сироватці крові вужа звичайного з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації

Показник	р. Самара, n = 11	р. Дніпро, n = 9
АСТ, од./л	103 ± 13	155 ± 14*
АЛТ, од./л	42,0 ± 10,2	77,5 ± 37,3*
Індекс де Рітиса, од.	2,71 ± 1,16	1,92 ± 0,92

Примітка: див. табл. 1.

Кількість сечовини у крові змії, виловлених в екосистемах р. Дніпро в межах м. Дніпропетровськ, зменшується майже на 81,8% порівняно з контролем (табл. 3).

Таблиця 3

#### Біохімічні показники ( $\bar{x} \pm SD$ ) сироватки крові вужа звичайного з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації

Показник	р. Самара, n = 11	р. Дніпро, n = 9
Сечовина, ммоль/л	2,16 ± 0,23	1,11 ± 0,52*
Азот сечовини, мг/л	3,82 ± 1,11	2,03 ± 0,82*
Лужна фосфатаза, од./л	50,3 ± 6,4	68,4 ± 7,2*
Глюкоза, ммоль/л	3,66 ± 0,24	3,81 ± 2,30

Примітка: див. табл. 1.

Подібне зменшення (на 90%) спостерігали також для кількості азоту сечовини. Такі зміни рівнів продуктів азотистого обміну у крові рептилій можуть указувати на зниження інтенсивності процесів обміну.

Концентрація глюкози в сироватці крові змії із двох місць мешкання не має достовірних відмінностей. Рівень глюкози крові рептилій варіює залежно від сезонної активності, тому зміни цього параметра можна оцінювати як неспецифічні та непоказові саме для антропогенного впливу, а зміну рівня глюкози слід розглядати в комплексі з іншими показниками. Враховуючи широкий діапазон норми цього показника, наведений для різних видів рептилій, отримані результати можна вважати такими, що відповідають нормі (Gosunoglu, 2011).

Достовірне підвищення (на 27%) відмічене для активності лужної фосфатази. Найбільша кількість цього ферменту спостерігається у печінці та кістках. Достовірне підвищення активності лужної фосфатази свідчить про фізіологічні зміни органів, у клітинах яких вона міститься. Отримані дані (табл. 3) перебувають у межах фізіологічної норми (Knotek et al., 2002; Vasilev, 2006; Stepanenko, 2013). Відомо, що показники загального обміну речовин (загальний кальцій, неорганічний фосфор, сечовина, азот сечовини) не видоспецифічні (Stepanenko, 2013). Кількість неорганічного фосфору в сироватці крові вужів, виловлених на антропогенно трансформованих територіях, зменшується на 31% (табл. 4).

Відповідно до змін концентрацій фосфору та незмінного рівня кальцію, співвідношення Ca/P достовірно підвищується майже на 30% у вужів з антропогенно трансформованих екосистем. Рівень кальцію у сироватці крові

самиць рептилій може значно підвищуватися (втричі – учетверо) лише в період репродуктивної активності.

Таблиця 4

**Вміст кальцію та фосфору ( $\bar{x} \pm SD$ ) у сироватці крові вужа звичайного з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації**

Показник	р. Самара, n = 11	р. Дніпро, n = 9
Загальний кальцій, ммоль/л	3,06 ± 0,13	3,19 ± 0,11
Фосфор неорганічний, ммоль/л	2,12 ± 0,45	1,63 ± 0,20*
Відношення Ca/P	1,43 ± 0,22	2,19 ± 0,31*

Примітка: див. табл. 1.

Метаболізм фосфору та його рівень у крові тісно пов'язаний із метаболізмом кальцію. Більшість рептилій мають концентрацію фосфору в сироватці крові у діапазоні 1,0–3,0 ммоль/л. Вміст кальцію та фосфору у крові звичайного вужа з досліджених районів перебуває в межах фізіологічної норми.

### Висновки

У вужів, вилонених на урбанізованій території, відмічене підвищення активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та лужної фосфатази, що вказує на певні порушення фізіологічного стану тварин. Для показників вмісту сечовини, азоту сечовини, неорганічного фосфору, співвідношення Ca/P, білкового коефіцієнта та активності лужної фосфатази спостерігаються відмінності між популяціями. Але отримані для цих показників значення перебувають у межах, відомих для плазунів. Активність трансаміназ у сироватці крові вужів дещо підвищена, особливо у змій з антропогенно трансформованих екосистем р. Дніпро. Таке підвищення може вказувати на наявність патологічних процесів в організмі.

Отримані дані щодо біохімічних показників сироватки крові звичайного вужа можуть бути використані у подальших дослідженнях як референтні показники, на основі яких можна визначати стан організму даного виду за впливу техногенного стресу.

### Бібліографічні посилання

Ananjeva, N.B., Orlov, N.L., Khalikov, R.G., Darevsky, I.S., Ryabov, I.S., Barabanov, A.V., 2006. The reptiles of North Eurasia. Taxonomic diversity, distribution, conservation status. Pensoft, Sofia.

Bulakhov, V.L., Gasso, V.Y., Pakhomov, O.Y., 2007. Biologichne riznomanittia Ukrajinu. Dnipropetrovs'ka oblast'. Zemnovodni ta plazuny (Amphibia et Reptilia) [Biological diversity of Ukraine. Dnipropetrovsk region. Amphibians and reptiles (Amphibia et Reptilia)]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).

Vasilev, D.B., 2006. Osteorenalniy sindrom u reptiliy: Osobennosti patogeneza i terapii [Osteo-renal syndrome in reptiles: Features of pathogenesis and therapy]. Veterinarnaya Patologiya 17, 85–89 (in Russian).

Vasilev, D.B., 2002. Fosforno-kaltsievyy obmen u nazemnyih pozvonochnyih. Nozologiya, sravnitel'naya patologiya, differentsial'naya diagnostika, terapiya osnovnyh, soputstvuyuschih i klinicheski shodnyh bolezney u reptiliy [Phosphorous-

calcium metabolism in terrestrial vertebrates. Nosology, comparative pathology, differential diagnosis, therapy of common, concomitant and clinically similar diseases in reptiles]. Proc. X Int. Vet. Cong. Moscow. Pp. 134–153 (in Russian).

Gasso, V.Y., 2011. Kharakteristika populyatsiy zvychnogo vuzha lisovyh biogeotsenoziv Prysamar'ia [Grass snake populations' features of the forest biogeocoenoses in the Samara River area]. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 19(2), 136–142 (in Ukrainian).

Kamyshnikov, V.V., 2004. Spravochnik po kliniko-biohimicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike [Handbook on clinical and biochemical research and laboratory diagnostics]. MedPress-Infarm, Moscow (in Russian).

Klymenko, O.Y., Gasso, V.Y., 2009. Aktyvnist transaminaz u syrovatci krovi prudkoyi yashhirky pid vplyvom promyslovogo zabrudnennya [Transaminases activity in the sand lizard's serum under influence of industrial pollution]. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 17(1), 100–105 (in Ukrainian).

Kolb, V.G., Kamyshnikov, V.S., 1976. Klinicheskaya biokhimiya. Posobie dlya vrachei-laborantov [Clinical chemistry. Manual for laboratory doctors]. Izdatelstvo Belarus, Minsk (in Russian).

Higgins, C., 2008. Rasshifrovka klinicheskikh laboratornykh analizov [Understanding laboratory investigations]. Binom, Moscow (in Russian).

Dickinson, V.M., Jarchow, J.L., Trueblood, M.H., 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. J. Wildlife Dis. 38(1), 143–153.

Knotek, Z., Hauptman, K., Knotkova, Z., Hajkova, P., Tichy, F., 2002. Haemogram and plasma biochemistry in green iguanas with renal disease. Acta Vet. Brno 71, 333–340.

Knotková, Z., Doubek, J., Knotek, Z., Hájková, P., 2002. Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). Acta Vet. Brno 71, 191–198.

Lisičić, D., Đikić, D., Benković, V., Horvat-Knežević, A., Oršolić, N., Tadić, Z., 2013. Biochemical and hematological profiles of a wild population of the nose-horned viper *Vipera ammodytes* (Serpentes: Viperidae) during autumn, with a morphological assessment of blood cells. Zool. Stud. 52, 11.

Lopez-Olvera, J.R., Montane, J., Marco, I., Martinez-Silvestre, A., Soler, J., Lavin, S., 2003. Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated Tortoise (*Testudo marginata*). J. Wildlife Dis. 39(4), 830–836.

Pagesm, T., Peinado, V.I., Viscor, G., 1992. Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauromys caspica leprosa*. Comp. Biochem. Physiol. 103A, 275–278.

Pakhomov, O.Y., Brygadyrenko, V.V., 2005. Konceptija systemy zahodiv z ohorony navkolyshn'ogo pryrodnogo seredovyssha Dnipropetrovs' koj'oblasti na 2005–2015 roky [Concept of system for actions on environment protection in Dnipropetrovsk region for 2005–2015]. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 10(1), 212–225.

Peterson, C.C., 2002. Temporal, population, and sexual variation in hematocrit of free-living desert tortoise correlational tests of causal hypotheses. Can. J. Zool. 80, 461–470.

Raphael, B.L., Klemens, M.W., Moehlan, P., Dterenfled, E., Karsch, W.B., 1994. Blood values in freeranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). J. Zoo. Wildlife Med. 25, 63–67.

Samour, J.H., Howlett, J.C., Silvanose, C., Hasbun, C.R., Al-Ghais, S.M., 1998. Normal haematology of free-living green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the United Arab Emirates. Comp. Clin. Pathol. 8, 102–107.

Stahl, S.J., 2006. Reptile hematology and serum chemistry. Proc. North American Veterinary Conf. 20, 1673–1676.

Stepanenko, A.A., 2013. Kliniko-biohimicheskie pokazateli obmena soedinitel'noy tkani v syvorotke krovi razlichnykh vidov reptiliy [Clinical and biochemical parameters of the

- exchange of connective tissue in the blood serum of different species of reptiles]. *Veterinary Medicine (Kharkiv)* 97, 477–478 (in Russian).
- Tosunoglu, M., Yilmaz, N., Gul, C., 2011. Effects of varying ecological conditions on the blood parameters of freshwater turtles in Canakkale (Turkey). *Ekoloji Dergisi* 20, 7–12.
- Wang, T., Brauner, C.J., Milsom, W.K., 1999. The effect of isovolemic anaemia on blood O<sub>2</sub> affinity and red cell triphosphate concentrations in the painted turtle (*Chrysemys picta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122A, 341–345.
- Zakharov, V.M., Clark, D.M. (ed.), 1993. *Biotest: Integral'naya otsenka zdorov'ya ekosistem i otde'nykh vidov* [Biotest: Integral assessment of the health of ecosystems and species]. Moscow (in Russian).

*Надійшла до редколегії 28.09.2016*