

С. М. Никитина

## РЕАКЦИЯ СВОБОДНОЖИВУЩИХ ГИДРОБИОНТОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЕСТЕСТВЕННОГО И АНТРОПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Описаны реакции гидробионтов на экзогенные биологически активные вещества естественного (БАВе) и антропогенного (БАВа) происхождения, особенности функционального спектра БАВе у эукариот разных таксонов и повреждающее воздействие БАВа как на организменном, так и на экосистемном уровнях.

This article considers the response of hydrobionts to exogenous biologically active substances of natural (BASn) and anthropogenic (BASa) origin, the peculiarities of BASn functional spectrum in eukaryotes of different taxons, and the damaging impact of BASa both at an organism and an ecosystem level.

**Ключевые слова:** биологически активные вещества, гормоны, водные беспозвоночные.

**Key words:** biologically active substances, hormones, marine invertebrates.

Биологически активные вещества естественного и антропогенного происхождения формируют информационный фон в среде обитания сообществ гидробионтов. Первыми реагируют на него одноклеточные и многоклеточные виды, находящиеся на низших уровнях гетеротрофов: инфузории, губки, гидры, планарии, мшанки, паразитические организмы. Обмен информацией обеспечивается системой специфической рецепции сигнала и его трансформации в конечный полезный эффект: реализацию адаптивных и репродуктивных свойств бионтов в сообществе. Этим и определяется степень устойчивости экосистем к антропогенному прессу (БАВа).

Цель работы – анализ данных о регуляторных механизмах и ответных реакциях свободноживущих водных беспозвоночных на БАВе и БАВа.

Представляемая работа базируется на многолетних экспериментальных исследованиях регуляторных соединений у гидробионтов разного таксономического уровня и их участия в обеспечении адаптаций к изменяющимся условиям среды и антропогенному прессу.

Объекты исследований: Protozoa – инфузории *Paramecium caudatum* Ehrbg., Metazoa – пресноводные губки *Spongilla lacustris* L. и *Ephidatia mulleri* Lieberkii, гидры *Hydra oligactis* Pallas, планарии – *Dugesia lugubris* и *Dendrocoelum lacteum* Muller, мшанки *Plumatella fungosa* P., ветвистоусые рачки *Daphnia magna* Straus.

Использованы водорастворимые гормональные препараты (Гп) окситоцинового ряда, преднизолон, фолликулин (эстрадиол) и тестостерон. Концентрация 0,02 мл Гп/л среды (условная норма – N – адекватна дозе при внутримышечном введении моллюскам или высшим ракообразным (на 1 кг массы тела) и соответствует введению внутримышечно 1 мл препарата человеку со средней массой тела 50 кг). Предельные концентрации в опытах выше или ниже N в 1000 раз.

В эксперименте с инфузориями отобраны концентрации: 0,06; 0,12; 0,18 и 0,25 мл Гп/л среды – и введена шкала баллов двигательной активности. В опытах с губками выбраны концентрации 0,002; 0,02 и 0,2 мл Гп/л. Учитывали стадии бластогенеза и соматического эмбриогенеза. При определении реакции гидр на гормональные препараты были использованы концентрации 0,004; 0,02 и 0,1 мл Гп/л. В исследовании реакции планарий на гормональные соединения отобраны концентрации 0,1; 0,15 и 0,2 мл Гп/л.

Концентрации БАВа (Na<sub>2</sub>S, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и ТПА – тетрагидрат парамолибдата аммония) рассчитаны, исходя из величины ПДК этих соединений для водоемов рыбохозяйственного пользования [5], или 500 мг/л сульфат-ионов и 0,916 мг/л соли для ТПА. Вода стоков ЦБЗ в хроническом эксперименте использовалась в разведениях от 1:3-м до 1:18.

Во всех экспериментах учитывали: выживаемость, пищевую и двигательную активность (ДА), особенности размножения и роста, изменяемость формы тела, наличие деструктивных процессов и особенности регенерации. Проводилась стандартная статистическая обработка результатов.

**Инфузории.** Во всех концентрациях гормональных соединений ДА инфузорий к концу первого часа опыта возвращается в доверительный интервал контрольной группы. В маммофизине с

префизоном (2-я концентрация) к 72 часам ДА инфузорий возросла до 6,2 балла. В той же концентрации преднизолона инфузории к 9 часам опыта выходили (без признаков поврежденности) на новый уровень ДА — 6,8 балла, летальный во всех других средах. Выражены достоверность ( $P = 0,05-0,001$ ) и однонаправленность (угнетение) действия всего ряда окситоциновых препаратов на бесполое размножение инфузорий. Преднизолон после 18 суток опыта вызывает достоверное ( $P = 0,02$ ) увеличение численности инфузорий относительно контроля (30 суток,  $11,8 \pm 0,12$  клетки/клетку).

Показателем токсического воздействия является нарушение ДА ресничного аппарата инфузорий. В среде с  $\text{Na}_2\text{S}$  при 0,5 и 0,25 ПДК время появления вращения — от  $35,0 \pm 2,8$  до  $42,8 \pm 5,6$  минут. Продолжительность вращения (минуты) возрастает по мере уменьшения концентрации раствора. В среде с 0,25 ПДК — это  $30,3 \pm 3,8$  минут. Время остановки вращения от начала эксперимента ( $7,4 \pm 0,7-76,1 \pm 8,3$  минуты) зависит от величины ПДК (10; 1,0; 0,5; и 0,25). Стопроцентный лизис инфузорий (в порядке уменьшения ПДК среды) наступает через  $17,5 \pm 1,4-79,3 \pm 4,2$  минуты. Сульфосоли натрия и ТПА нарушают работу выделительного аппарата инфузорий. В среде с  $\text{Na}_2\text{S}$  отекает одна из вакуолей. В среде с  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  равномерно отекают обе вакуоли. В среде с ТПА инфузории становятся шарообразными. В среде с 0,50 и 0,25 ПДК максимальное время выживания 50 % инфузорий — 35–40 минут. С 72 до 144 часов опыта скорость популяционного роста в эксперименте при 0,125 ПДК меньше контроля в 1,3–2,9 раза. Наиболее токсичен  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  — отсутствует первое поколение. В остальных средах практически исчезает третья и в половине случаев второе поколение.

**Губки.** В контроле за 25 суток наблюдался прирост 0,09 г/г тела колонии. Максимальным он был в средах с окситоцином, гифотоцином и префизоном (0,3–0,5 г/г). Преднизолон вызвал достоверное (от  $4,76 \pm 0,25$  до  $3,71 \pm 0,28$  г) уменьшение массы колоний. «Раскрытие геммул» в контрольной группе с «промораживанием» —  $240 \pm 3,7$ , без него —  $264 \pm 3,3$  часа. Максимальное ускорение этой стадии было в группах с пептидными БАВе — на 72 часа в окситоцине (0,2 мл Гп/л). В среде с окситоцином образование устойчивых конгломератов завершается за  $24 \pm 0,7$  часа (в контроле —  $88 \pm 5$  часов). Преднизолон в среде максимальной концентрации тормозит (до  $112 \pm 2,4$  часа) их образование. В контроле продолжительность стадии образования спикул —  $136 \pm 3,0$  часа, в средах с окситоцином или гифотоцином (0,2 мл Гп/л) —  $104 \pm 1,6$  часа; в преднизолоне (0,2 мл Гп/л) —  $154 \pm 3,0$  часа. Повышение ДА воротничковых клеток вызвало существенное ускорение формирования водоносной системы ( $166 \pm 3,8$  часа) пептидными БАВе по сравнению с контролем ( $243 \pm 4,4$  часа).

Продолжительность бластогенеза в контроле от  $798 \pm 4,6$  до  $816 \pm 6,9$  часа. Минимальное время отмечено в окситоцине (0,2 мл Гп/л) —  $495 \pm 7,3$  часа. Преднизолон увеличил время бластогенеза до  $810 \pm 8,8-880 \pm 9,4$  часа. В контроле время завершения соматического эмбриогенеза ( $616 \pm 5,7$  часа) несколько больше времени прохождения 2 — 5-й стадий бластогенеза ( $548 \pm 3,7$  часа). Время соматического эмбриогенеза в окситоцине —  $432 \pm 7,0$  часа.

**Гидры.** В контроле (9 суток) количество почек на гидру (ПГ) было 0,0–0,4. Наибольшее значение ПГ получено в преднизолоне ( $5,6 \pm 1,8$ ). Все пептидные препараты дают сходные значения (от  $3,8 \pm 0,5$  до  $4,3 \pm 1,4$ ). С третьих суток во всех экспериментальных группах происходит достоверное ( $P = 0,01-0,05$ ) увеличение ПГ. Дисперсионный анализ влияния БАВе (В) и длительности экспозиции (А) показал достоверность для фактора В (при  $P = 0,05$ ) во всех гормональных средах. Взаимодействие факторов А и В не доказано. Все гормональные препараты, кроме гонадотропина, задерживают переход гидр к половому размножению. Гонадотропин (0,02 мл Гп/л) при  $t = 10$  °C вызвал переход их к половому размножению. На 39-е сутки появились молодые особи (50 % от числа погибших). Через 10 суток молодые гидры начали почковаться. Питуитрин, маммофизин, префизон, гонадотропин ускорили развитие второй почки при сформированном головном отделе у первой; питуитрин, гонадотропин и преднизолон — при одном сформированном подошвенном отделе.

Первой реакцией гидр на воздействие токсикантов был цикл спонтанных сжатий и расслаблений в течение 1–30 минут и нарушение пищевой активности: неполное поедание пищи, отказ от нее, повреждение вольвентов. Введение в среду гидрокортизона снимало нарушение пищевого процесса. Высокие концентрации  $\text{Na}_2\text{S}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  вызвали гибель гидр в первые минуты опыта, с эффектом коагуляции белков. В 0,50 и 0,25 ПДК гибель 50 % гидр произошла к 3,0 и 6,5 суткам. Стопроцентный лизис наступил на 5-е и 16-е сутки соответственно. В среде с ТПА (1 ПДК) 50%-ная гибель отмечена в 1-е сутки, 100%-ная — к 11-м суткам. При добавлении

гидрокортизона в среду с 0,5 ПДК  $\text{Na}_2\text{S}$  отмечены единичные случаи почкования на 3–4-е сутки опыта, увеличение времени до гибели 50 % гидр на 3 суток и продолжительности жизни оставшихся на 6 суток. В среде 0,25 ПДК влияние гормона увеличило время до гибели 50 % гидр на 9–13 суток. В контроле у гидр восстановление орального и аборального регенерантов завершалось на 7-е сутки. Сульфосоли (0,5–0,25 ПДК) тормозили регенерацию, и к 7-м суткам были отмечены первые признаки лизиса. Гидрокортизон сократил время регенерации на 2 суток, гидры активно почковались. Удвоение численности отмечено на 6-е сутки.

**Планарии.** Средний балл ДА (СБДА) планарий в контроле был  $0,48 \pm 0,08$ – $0,60 \pm 0,09$ , в среде с гидрокортизоном  $0,55 \pm 0,06$ – $0,83 \pm 0,17$  балла. СБДА планарий в разведениях стоков ЦБЗ был от  $0,84 \pm 0,14$  до  $1,30 \pm 0,21$  балла. Гидрокортизон нормализовал СБДА в этих средах до  $0,55 \pm 0,09$ – $0,78 \pm 0,16$  баллов. В эксперименте межвидовых различий скорости движения у двух видов планарий нет:  $6,8 \pm 1,3$  см/мин –  $6,4 \pm 0,9$  см/мин. В средних концентрациях гормональных соединений выделяются две пары гормонов: окситоцин – маммофизин, которые выводят ДА планарий на уровень 2,5–2,8 балла за 120–180 минут, и префизон – гонадотропин, которые за 45 минут обеспечивают ДА в 1,5–2,0 балла. В первой паре возврат к контролю заканчивается к 3,5 часа, во второй к 3,0 часам опыта.

В эксперименте межвидовых различий поисковой активности (ПА) планарий нет ( $12,0 \pm 1,2$ – $44,0 \pm 0,6$ ), но в контроле у планарий она полностью отсутствует. В среде с окситоцином ПА была от  $22 \pm 1,6$  до  $42 \pm 1,5$ , в среде с гонадотропином – от  $12 \pm 1,2$  до  $36 \pm 0,8$ . После 60 минут опыта ПА возвращается к контролю, копуляции не отмечены. Наибольшая копулятивная активность ( $14,0 \pm 2,0$  и  $17,0 \pm 2,0$ ) отмечена у обоих видов в максимальной концентрации окситоцина, которая активизирует «кучкуемость» планарий в первые 3 часа эксперимента. Одной планарией за 120 часов в окситоцине отложено  $2 \pm 0,5$  кокона, в префизоне –  $1,7 \pm 0,1$ , в маммофизине –  $1,2 \pm 0,2$ , в гонадотропине –  $0,4 \pm 0,1$  кокона. Количество эмбрионов в коконе в среде с гонадотропином было  $5 \pm 0,6$ , маммофизинном –  $7 \pm 1,0$ , префизоном –  $8 \pm 1,0$ , окситоцином –  $9 \pm 1,4$ . Время развития эмбрионов в коконе из естественных условий равно  $9 \pm 0,8$  суток, в гонадотропине –  $8 \pm 1,2$ , окситоцине и маммофизине –  $7 \pm 1,2$ , в префизоне –  $6 \pm 0,8$  суток. *D. lugubris* вскармливались фрагменты дождевого червя, предварительно инъецированного избыточным количеством фолликулина (Ф) или тестостерона (Т). Установлены влияния Ф и Т на регенерацию и гормонзависимость плодовитости у регенерантов. ТПА (1 ПДК) ингибирует регенерацию и головного, и туловищного регенерантов. Гидрокортизон активизирует этот процесс, особенно на стадии формирования ЦНС и фоторецепторов. На 5-е сутки глаза были у 73 % особей в контроле, у 87 % – в среде с гидрокортизоном, у 33 % – в среде с ТПА. Внесение гормона в среду с ТПА повысило процент особей с глазами до 53 %, т.е. гидрокортизон частично компенсирует отрицательный эффект ТПА.

**Мшанки.** В контрольной и экспериментальных группах мшанок (ТПА и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) масса колоний по мере их старения равномерно снижалась без достоверных различий. Достоверные различия ( $P = 0,05$ ) в уменьшении массы колоний мшанок получены только при одновременном воздействии сочетаний ТПА (1 ПДК) и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0,20–0,08 ПДК). Статобласты мшанок в контроле были однородны по размерам и массе. Размеры статобластов, сформированных в средах с  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ТПА и их сочетаниями, превосходили контрольные в 1,2–2,0 раза. Распределение массы в контроле равно  $55,4 \text{ мг} \cdot 10^{-3}/\text{мм}^2$ . В среде с ТПА этот показатель уменьшается до  $29,2$ – $2,2$ , в среде с  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – до  $6,1$ – $2,0$ , при комбинированном воздействии этих соединений – до  $2,8$ – $1,2 \text{ мг} \cdot 10^{-3}/\text{мм}^2$ , т.е. при увеличении размера статобластов произошло значительное уменьшение их массы. Статобласты всех экспериментальных групп не имели внутри живых клеток.

**Дафнии.** Окситоцин и эстрадиол увеличили число линек на 2–20 % относительно контроля (50–62 %). БАВе практически не изменяют количество яиц в яичнике, но окситоцин и эстрадиол значительно увеличивают количество жизнестойкой молоди (плодовитость), продуцируемое одной самкой в сутки: окситоцин до 7,5 (7,0–7,9), эстрадиол до 6,8 (5,7–8,0). Средняя плодовитость в контроле – 5,6. У контрольных дафний содержание гидрокортизона было от 8,4 до 12,7 пмоль/г (среднее – 10,5), кортикостерона – от 6,9 до 10,2 пмоль/г (среднее – 8,5). Окситоцин активировал синтез эндогенного гидрокортизона до 17,3 пмоль/г (11,6–21,2), не изменив содержание кортикостерона – 8,8 пмоль/г (6,3–12,1). Экзогенный эстрадиол вызвал увеличение концентрации кортикостерона до 18,6 пмоль/г (14,0–20,2) и гидрокортизона до 14,8 пмоль/г, при существенных сезонных различиях: от 8,3 осенью до 22,4 – весной.

В стоках ЦБЗ (разведение 1:18) в трех поколениях дафний выживаемость по сравнению с контролем снизилась на 22,5–33,1 %. При увеличении концентраций стоков и в средах с ТПА,  $\text{Na}_2\text{S}$ , ТПА +  $\text{Na}_2\text{S}$  происходят изменения: замедление темпа роста, удлинение периода наступления половой зрелости, увеличение времени между двумя выметами, эмбриональной

смертности, возрастающие в ряду поколений. Это объясняет исчезновение дафний в проблемных зонах водоемов.

Свидетельством информационной роли БАВ является чувствительность гидробионтов всех изученных таксонов [1–5; 12–13] – как свободноживущих, так и паразитических к экзогенным БАВе и БАВа, в том числе к компонентам сточных вод и гормональным соединениям позвоночных. Наличие аденилатциклазной сигнальной активности (АЦС), АКТГ и молекул, иммунологически сходных с хорионическим гонадотропином и половыми стероидами [6–11], обеспечивает то, что исследуемые соединения у животных самого низкого филогенетического уровня не выходят за рамки их функциональных возможностей у многоклеточных животных. Величина реакции на БАВ и ее локализация зависят от скорости переноса информации, наличия циторцепторного аппарата, принимающего сигналы опосредованно через распределительную систему, и от степени блокировки переноса и восприятия сигнала, т.е. от интеграционного уровня.

Нижний предел концентраций изученных гормональных соединений, на которые инфузории и планарии отвечают, – 3–5 N. У губок и гидр нижний предел 0,1–0,5 N. Максимальные (толерантные) концентрации 0,20–0,25 мг Гп/л – 10–12,5 N. Инфузории и планарии обладают более низкой чувствительностью к гормональным соединениям. Губки и гидры реагируют на меньшие концентрации гормонов в среде. У инфузорий и планарий ответ на воздействие идет на уровне целостного, достаточно интегрированного и защищенного (кортекс, кожно-мышечный аппарат) организма. У гидр, несмотря на наличие нервной и нейросекреторной систем, и у губок, у которых нет интеграционного аппарата, ответ обеспечивается на клеточном уровне. Чувствительность их к БАВа находится на уровне 0,5–0,125 ПДК для водоемов рыбохозяйственного пользования, т.е. существенно выше, чем у стандартных тест-объектов, используемых для установления ПДК. Уже при этих концентрациях БАВа отмечены морфофункциональные изменения инфузорий, гидр и мшанок, нарушение у них полового и бесполого размножения, изменение поисковой активности, в том числе и у паразитов рыб на разных стадиях развития.

### Заключение

Представители низшего уровня гетеротрофов в водоемах испытывают негативное воздействие БАВа, изученных в данном исследовании, в концентрациях, существенно меньших ПДК для водоемов рыбохозяйственного пользования. Нарушение работы выделительного и пищеварительного аппаратов приводит к гибели животных. Угнетение митозов приводит к уменьшению численности (инфузории, гидры) и при ингибировании репродукции может стать причиной «выпадения» их из водных экосистем. Сопоставление влияния БАВа на свободноживущих гидробионтов с анализом паразитофауны рыб р. Преголи и Вислинского залива позволяет говорить о реальности прямого и опосредованного влияния на нее БАВа. Компенсаторная роль экзогенного гидрокортизона (в экспериментах с БАВа) и отсутствие массовых видов свободноживущих (и паразитических) гидробионтов в особо загрязненных зонах водоемов свидетельствует о том, что эндогенные системы, обеспечивающие выживание и размножение животных, не в состоянии противостоять антропогенному прессу. В не подвергающихся действию БАВа экосистемах существующий информационный поток БАВе обеспечивает их относительную устойчивость.

### Список литературы

1. Никитина С.М. Стероидные гормоны беспозвоночных животных. Л., 1982.
2. Никитина С.М. О прижизненном определении пола двухстворчатых моллюсков // Физиолого-биохимические основы кормления рыб в аквакультуре: сб. науч. тр. Калининград, 1995. С. 76–82.
3. Никитина С.М. Влияние экзогенных стероидных соединений на эмбриогенез у прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis*, Lam.) // Гидробиологические исследования в бассейнах Атлантического океана: сб. науч. тр. Калининград, 2000. С. 114–125.
4. Никитина С.М. Участие глюкокортикоидов в адаптации беспозвоночных гидробионтов к изменяющимся условиям среды // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: тез. докл. Международная конф. (6–9 сентября 2004 г., г. Петрозаводск). Петрозаводск, 2004. С. 102.
5. Никитина С.М., Шеламкова Г.В. Реакция гидробионтов разного таксономического уровня на изменение химизма среды // К 40-летию Калининградского отделения Гидробиологического общества РАН: сб. науч. тр. Калининград, 2005. С. 102–115.
6. Перцева М.Н. Молекулярные основы развития гормонкомпетентности. Л., 1989. С. 234.

7. Шейман И.М., Балобанова Э.Ф. Пептидные гормоны беспозвоночных // Успехи совр. биологии. 1986. Т. 101, вып. 2. С. 203–213.
8. Шпаков А.О., Деркач К.В., Гурьянов И.А. и др. Ингибирующее влияние поликатионных пептидов на регуляцию аденилатциклазы гормонами у инфузорий *Deleptus anser* // Цитология. 2005. Т. 47, №8. С. 714–722.
9. Grimmelikhuijzen C.J.P., Williamson L., Hansen G.N. Neuropeptides in cnidarians // Can. J. Zool. 2002. Vol. 80, №10. P. 1690–1701.
10. Kawahara G., Terakado K., Sekiguchi T. и др. Adrenocorticotropin-like immunoreactivity in the granules of neural complex cells of the ascidian *Halocynthia roretzi* // Zool. Sci. 2002. Vol. 19, №9. P. 1061–1065.
11. Twan Wen-Hung, Wu Hua-Fang, Hwang Jiang-Shiou и др. Corals have already evolved the vertebrate-type hormone system in the sexual repron // Fish Physiol. and Biochem. 2005. Vol. 31, №2–3. P. 111–115.
12. Nikitina S.M., Evdokimova E.B. On probable response of free-living and parasitic invertebrates to BAS impact // Ecsa Symposium 42 «Estuarine ecosystems structure function and management», 16–22 September 2007. Kaliningrad-Svetlogorsk, Russia. Kaliningrad, 2007. P. 85–86.
13. Nikitina S.M. Steroid hormones of invertebrates // Ecsa Symposium 42 «Estuarine ecosystems structure function and management», 16–22 September 2007. Kaliningrad- Svetlogorsk, Russia. Kaliningrad, 2007. P. 83–85.

### Об авторе

С.М. Никитина — д-р биол. наук, профессор, РГУ им. И. Канта, Swetmih@Gmail.com

### Author

Professor S.M. Nikitina, IKSUR, Swetmih@Gmail.com