

Н. П. Кудикина

**DAPHNIA MAGNA STRAUS (1826) (CLADOCERA, CRUSTACEA)
КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ЭНДОКРИННЫХ НАРУШЕНИЙ У ГИДРОБИОНТОВ**

*Изучен характер воздействия препарата преднизолон – аналога гормона позвоночных гидрокортизон – на активность соматического роста, работу кровеносной системы, плодовитость и рождаемость ветвистоусого рачка *Daphnia magna* Straus (1826) (Cladocera, Crustacea) в ряду трех последовательных поколений. Гормон оказал достоверное влияние на исследуемые морфофункциональные показатели жизнедеятельности дафний. Это свидетельствует о чувствительности выбранного тест-объекта к экзогенным гормонам и позволяет предложить использовать дафний для оценки эндокринных нарушений у гидробионтов.*

*This article examines the effect of prednisolone – an analogue of the vertebrate hormone hydrocortisone – on the activity of somatic growth, blood system function, fecundity, and reproductive rate in *Daphnia* Straus (1826) (Cladocera, Crustacea) in three consecutive generations. This hormone had a proven effect on the studied morpho-functional characteristics of *Daphnia*. It indicates that the test object is sensitive to exogenous hormones, therefore, *Daphnia* can be used in assessing endocrine disorders in aquatic organisms.*

Ключевые слова: ракообразные, дафнии как тест-объекты, преднизолон, эндокринные нарушения, соматический рост, частота сердечных сокращений, плодовитость, рождаемость.

Key words: crustaceans, *Daphnia* as a test object, prednisolone, endocrine disorders, somatic growth, rate of cardiac contractions, fecundity, reproductive rate.

Появляется все больше сведений о наличии в водной среде веществ, вызывающих нарушения в эндокринной системе гидробионтов. Такие расстройства могут вызывать промышленные ксенобиотики, природные гормоноподобные соединения (микоестрогены, дифенольные фитоэстрогены и др.), а также гормональные соединения, попадающие в воду с различными стоками и как продукты метаболизма гидробионтов [1–3].



Эндокринные механизмы управления метаболизмом действуют на разных уровнях организации. Этим объясняется высокая чувствительность эндокринной системы к любым внешним и внутренним факторам, нарушающим гормональный гомеостаз в организме животных [4].

Одна из самых острых проблем экологического мониторинга — поиск индикаторов, обладающих хорошо выраженной чувствительностью к определенной группе соединений. Для изучения эндокринных нарушений тест-объекты должны иметь хорошо сформированную эндокринную систему, обеспечивающую их чувствительность к гормональным факторам, а фенотипические изменения — отражать характер воздействия фактора и степень его отклонения от нормы.

Среди беспозвоночных наиболее развитой и хорошо изученной эндокринной системой с наличием всех основных элементов, характерных для позвоночных, обладают ракообразные [5–7]. По химической природе гормоны ракообразных представлены как специфическими для этой группы соединениями, так и гормонами, идентичными пептидным и стероидным гормонам позвоночных. Растущее внимание к группе стероидов связано с появлением в литературе данных об их физиологической роли у ракообразных в реализации основных процессов жизнедеятельности [3; 8–10]. У отдельных видов при экзогенном введении часть из них способна влиять на рост, размножение и стероидный метаболизм [2; 3; 11; 12]. Однако эти работы немногочисленны и касаются лишь отдельных сторон физиологической активности.

Благодаря хорошо развитой эндокринной системе и высокой чувствительности к экзогенным гормональным факторам ракообразные могут стать удобным тест-объектами для изучения эндокринных нарушений. В практике токсикологии для этого давно используется ветвистый рачок *Daphnia magna* Straus (1826).

Цель работы было изучение влияния преднизолона — синтетического аналога гидрокортизона (гормона группы глюкокортикоидов) — на изменения комплекса морфофункциональных особенностей ветвистого рачка *D. magna* в ряду трех последовательных поколений для разработки тест-методики оценки характера воздействия экзогенных гормональных соединений на гидробионтов.

Материалы и методика

В эксперименте использовали рачков *D. magna* Str. (Cladocera, Crustacea) в возрасте 2–3 дней размерами 0,8–1,2 мм из лабораторной культуры. Каждый эксперимент длился 28 суток. Изучали характер воздействия гормонального препарата стероидной природы — преднизолона. Экспериментальные среды для содержания рачков получали путем внесения в дехлорированную воду гормонального препарата. Использованный препарат преднизолон представляет собой дегидрированный аналог гидрокортизона и обладает сходными с ним свойствами, но его воздействие эффективнее самого гидрокортизона в 3–5 раз.

Рабочие концентрации гормона определяли в ходе серии предварительных экспериментов с использованием линейки разных концентраций гормонов. Средой для содержания контрольных животных служила дехлорированная вода. Животные содержались в сосудах емкостью 500 мл при температуре 17–19 °С. Плотность посадки составля-



ла 20 ос./л. Смену растворов и кормление животных проводили через каждые 72 часа. В качестве корма использовали свежеприготовленную смесь из негустой суспензии пекарских дрожжей и гомогенат различных водорослей. Численность особей в контрольной и экспериментальной группах составляла 300 рачков. Полученные данные по двум экспериментальным группам дафний были объединены, поскольку они оказались практически идентичными.

Экспериментальные серии опыта проведены в двух повторностях. Характер воздействия выбранной концентрации препарата изучался на трех последовательных партеногенетических поколениях дафний: родительское поколение (Р), первое (F1) и второе (F2) дочерние поколения. Препарат вносили в первые сутки эксперимента, и исследуемые показатели регистрировали один раз каждые три дня после начала опыта. Исследовали характер влияния преднизолона на линейный рост дафний (мм), частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин), плодовитость (число яиц в выводковых камерах, экз. яиц/самку) и рождаемость (экз. личинок / самку). Цифровые данные обрабатывались стандартными статистическими методами с использованием критерия Стьюдента при уровне достоверности 95 %.

Результаты исследований

В среде с преднизолоном у животных родительского поколения активность соматического роста снижалась, особенно заметно в период с 7-х по 10-е сутки опыта. Ингибирующий эффект сохранялся до 16-х суток. Во второй половине эксперимента выявлен противоположный эффект препарата. Размеры дафний до конца эксперимента достоверно превышали контрольные значения.

У дафний F1 показатели соматического роста в экспериментальной группе начиная с 4-х суток опыта были достоверно выше контрольных. Высокая скорость роста сохранялась в этой группе до 16-х суток опыта. С начала последней декады эксперимента и до его конца интенсивность роста в обеих группах совпадала, поэтому конечные размеры дафний были сходными.

Тенденция к увеличению активности линейного роста сохранялась у дафний F2 начиная с 4-х суток опыта и до конца эксперимента. Дефинитивные размеры животных в обеих группах достоверно различались между собой (табл. 1).

Таблица 1

Изменение линейных размеров (мм) под влиянием преднизолона

Группа	Сутки опыта									
	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28
Рк	1,0	1,3	2,0*	2,4*	2,5	2,9	3,0	3,0*	3,1*	3,2*
Рэ	1,0	1,2	1,7	2,1	2,3	2,7	3,1	3,3	3,4	3,5
F1к	1,0	1,4	2,1*	2,5*	2,7*	3,9*	3,1	3,2	3,2	3,2
F1э	1,0	1,8	2,3	2,9	3,0	3,1	3,1	3,2	3,2	3,3
F2к	1,1	1,3	1,7*	2,1*	2,4	2,5*	2,7	2,8	2,8*	—
F2э	1,1	1,6	2,3	2,5	2,7	2,9	3,0	3,1	3,3	—

К – контроль; Э – эксперимент; * – достоверные различия.



Наличие экзогенного преднизолона существенно влияло на активность работы сердца животных. У дафний родительского поколения сразу после внесения препарата наблюдалось резкое снижение частоты сердечных сокращений. Ингибирующее действие сохранялось в течение 7 дней. В дальнейшем присутствие препарата, наоборот, приводило к постепенному усилению сердечной деятельности. Максимальные значения ЧСС были зарегистрированы в период с 13-х по 16-е сутки эксперимента. В последней декаде эксперимента стимулирующий эффект снижался вплоть до полного исчезновения в последние дни опыта.

После помещения в среду с гормоном у дафний дочернего поколения F1 наблюдалось стойкое снижение ЧСС, продолжавшееся в течение 14 суток опыта. Положительный эффект был очень кратковременным – только 16-е сутки). До конца эксперимента показатели ЧСС в обеих группах различались мало.

Содержание в растворе с преднизолоном дафний F2 приводило к резкому снижению ЧСС. Выраженный кардиотоксический эффект был заметно короче, чем у дафний F1 – всего 3 суток (4–7-е сутки). И в этом случае до конца эксперимента работа сердца в исследуемых группах существенно не отличалась (табл. 2).

Таблица 2

Изменение ЧСС (уд./мин) под влиянием преднизолона

Группа	Сутки опыта									
	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28
Рк	312*	331*	348*	324*	281*	291*	272	292	280	304
Рэ	260	302	334	394	317	320	287	301	274	312
F1к	352	352*	361	313*	338*	272*	320	286	300	300
F1э	348	311	316	279	310	323	306	308	301	200
F2к	300	338*	353*	315	316*	314*	316	314	314	–
F2э	300	280	296	306	336	330	310	308	310	–

К – контроль; Э – эксперимент; * – достоверные различия.

Появление первых яиц в выводковых камерах дафний (Р) опытной и контрольной групп было зарегистрировано на 7-е сутки опыта. Количество яиц у самок в среде с препаратом была заметно выше, чем в контроле. К 13-м суткам плодовитость рачков достигла максимальных значений (9,3 яиц/самку), в контрольной группе их было почти в 3 раза меньше (3,2 яиц/самку). Максимальная активность откладки яиц сохранялась у экспериментальных дафний в течение 7 дней (13–19-е сутки). В контроле пик начался позже и был короче по времени (19–22-е сутки). Максимальные значения плодовитости у интактных и опытных животных близки между собой. По мере завершения эксперимента динамика яйцекладки в исследуемых группах различалась: в контроле снижалась постепенно, а в экспериментальной группе на 25-е сутки опыта был зарегистрирован еще один отчетливый пик ее увеличения.



В выводковых камерах дафний F1 первые яйца появились одновременно с контролем — на 4-е сутки опыта. Преднизолон заметно стимулировал активность их формирования: к 7-м суткам различия между плодовитостью рачков двух исследуемых групп достигли достоверных значений. Максимальные значения были зарегистрированы у экспериментальных животных уже на 10-е сутки опыта. Высокая активность откладки яиц сохранялась у них в течение следующих 6 дней (10–16-е сутки). У интактных животных максимальный уровень плодовитости был отмечен только на 13-е сутки опыта, после чего активность формирования яиц резко снижалась и уже к 16-м суткам достигала минимума. В экспериментальной группе это происходит позднее, на 19-е сутки опыта. При завершении эксперимента количество яиц у самок обеих групп было сходным.

У дафний третьей генерации резкое увеличение плодовитости происходит в самом начале опыта — уже к 7-м суткам регистрировалось максимальное количество яиц, почти в 8 раз превышающее контрольные значения. После этого их число постепенно снижалось, оставаясь до 16-х суток существенно выше, чем в контроле (более чем в 1,5 раза). Далее, до конца количество яиц у экспериментальных дафний было выше, чем в контроле, но уровень зарегистрированных различий оказался значительно ниже, чем в начале опыта. Максимальная плодовитость дафний в чистой воде наблюдалась позже, чем в опыте, — на 10-е сутки, после чего существенно не менялась. В конце эксперимента плодовитость в обеих группах была практически одинаковой (табл. 3).

Таблица 3

Изменение плодовитости (экз. яиц/самку) под влиянием преднизолона

Группа	Сутки опыта									
	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28
Рк	—	—	2,3*	5,3	3,2*	5,9*	9,8	8,0*	3,0*	1,6
Рэ	—	—	3,9	6,7	9,3	7,6	9,7	5,0	7,5	1,9
F1к	—	2,2	2,5*	7,1*	10,4	3,2*	6,4	3,9	5,6	5,7
F1э	—	3,5	4,6	10,4	9,4	10,6	6,1	5,7	5,7	5,7
F2к	—	—	0,8	0,8*	3,4*	1,1*	6,7*	4,0*	3,5	—
F2э	—	—	1,1	4,0	6,2	3,1	13,0	8,0	5,0	—

К — контроль; Э — эксперимент; * — достоверные различия.

В двух группах родительского поколения (Р) выход молоди начинался одновременно — на 10-е сутки опыта. Динамика этого процесса в эксперименте и контроле различалась. В контрольной группе максимальное число молоди появлялось в течение 13–16-х суток, после этого активность выхода резко снижалась и к 19-м суткам достигала минимума. У экспериментальных животных высокие и близкие по значению к контролю показатели держались вплоть до 19-х суток, после чего коли-



чество молоди постепенно снижалось. В чистой воде непосредственно перед завершением эксперимента (25-е сутки) возникал еще один короткий пик активности выхода молоди.

Появление первых потомков у дафний F1 как в опыте, так и в контроле, совпало (7-е сутки). Количество рождаемых особей в гормональной среде были значительно ниже контрольного уровня. Активность выхода молоди в экспериментальной группе нарастала гораздо быстрее, чем в чистой воде, и в течение 10–13-х суток опыта их количество было уже достоверно выше, чем в контроле, где это произошло только к 16-м суткам. Во второй половине эксперимента динамика рождаемости в исследуемых группах была сходной. Количество молоди в обеих группах также совпадало. Исключение — последние сутки опыта, когда у животных в чистой воде произошел резкий скачок рождаемости.

В контрольной и опытной группах дафний F2 первая молодь появилась на 7-е сутки. Рождаемость была сходной. Динамика активности выхода молоди в чистой воде и среде с гормоном совпадала. В течение всего опыта количество рождаемых особей у экспериментальных животных было выше, чем у контрольных (табл. 4).

Таблица 4

Изменение рождаемости (экз. личинок /самку) под влиянием преднизолона

Группа	Сутки опыта									
	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28
Рк	—	—	—	2,9	6,7	6,6*	1,6*	2,0*	3,8*	1,3
Рэ	—	—	—	3,3	6,2	5,0	5,6	3,8	2,1	1,1
F1к	—	—	2,2*	2,5*	3,8*	6,8	5,7	2,7	1,4	13,3
F1э	—	—	0,03	4,6	6,4	6,6	6,0	3,4	2,0	8,0*
F2к	—	—	0,8	0,8*	3,4*	1,1*	6,7*	4,0*	3,5*	—
F2э	—	—	1,1	4,0	6,3	3,1	13,6	8,0	5,0	—

К — контроль; Э — эксперимент; * — достоверные различия.

Обсуждение результатов

Выявлена общая тенденция в характере воздействия препарата на соматический рост и репродуктивную активность. Она проявляется в усилении стимулирующего эффекта гормона в ряду исследуемых поколений. В рамках этой тенденции каждой генерации дафний были присущи свои особенности ответных реакций, связанные с различиями исследуемых физиологических функций.

По отношению к ростовым и анаболическим процессам у позвоночных глюкокортикоиды служат антагонистами соматотропного гормона, регулирующего рост. Однако их активность может значительно варьировать в зависимости от концентрации. Введение заместительных доз кортизола адреналэктомированным животным способствует их росту, тогда как фармакологические дозы его тормозят [13].

У ракообразных процессы роста, созревания и размножения тесно сопряжены с личным циклом, нормальный ход которого обеспечива-



ется сложной системой эндокринной регуляции, включающей нейро-секреторные центры и специализированные эпителиальные железы. Известны две основные группы гормонов, управляющих линькой: нейросекреторные гормоны комплекса X-орган — синусная железа, ингибирующие линьку, и стероидные гормоны экдизоны, производные Y-органа, стимулирующие ее [6].

У некоторых ракообразных показано наличие еще одной группы стероидов — половых и глюкокортикоидов, — идентичных гормонам позвоночных. Они активно участвуют в регуляции разных этапов онтогенеза [2; 5; 7; 8].

128

Наиболее подробно количественное содержание глюкокортикоидов изучено в жизненном цикле двух видов речных раков. Динамика гидрокортизона тесно коррелирует с характером распределения гликогена в тканях на разных стадиях линьки, что вполне согласуется с общими представлениями о них как о регуляторах жирового и углеводного обмена. Это позволяет предположить, что глюкокортикоиды, наряду с экдизонами, могут участвовать в обеспечении всех пред- и послелинчных перестроек [8].

Прямые указания на участие гидрокортизона в процессе линьки у дафний отсутствуют. Косвенным подтверждением этого может служить изменение количества данного гормона у дафний под влиянием экзогенных окситоцина и эстрадиола, сопровождавшееся увеличением числа линек и плодовитости [3]. Линька и выход потомства у дафний синхронизированы: молодь выходит из выводковых камер непосредственно перед линькой [14]. Обнаруженное нами возрастание рождаемости у экспериментальных дафний, возможно, косвенное подтверждение увеличения числа линек. Это дает преимущества экспериментальным животным для увеличения линейных размеров тела по сравнению с интактными.

Можно предположить, что наличие в среде преднизолона приводит к нарушению природного баланса гормонов и, как следствие, изменению общего уровня метаболизма у дафний, что нашло свое отражение в нарушении работы всех систем организма.

Подтверждением способности экзогенных стероидов включаться в регуляцию процессов линьки и размножения служат опыты с модельным эстрогеном диэтилстилбэстролом (ДЭС). Нарушение гормонального гомеостаза, вызванное изменением систем его ферментного обеспечения, проявлялось в снижении числа линек и плодовитости в ряду нескольких поколений дафний. Кормление креветок *Fenneropenaeus indicus* (у автора — устаревшее *Penaeus indicus*) пищей с добавками пропionato тестостерона и ДЭС приводило к увеличению скорости роста, а гонадотропин человека задерживал рост ювенильных особей [12].

В линичном цикле ракообразных процессы роста и размножения регулярно чередуются друг с другом. Это связано с последовательностью включения гормонов, стимулирующих и подавляющих линьку [6]. Одновременное увеличение линейных размеров, рождаемости и плодовитости у экспериментальных дафний свидетельствует о нарушении естественного механизма регуляции этих процессов под влиянием



преднизолона. Нарастание стимулирующего эффекта в ряду исследованных поколений может быть связано с накоплением гормона в организме дафний, постоянно живших в экспериментальных средах. Нарушения эндокринного гомеостаза, вызванные преднизолоном, могли привести к нарушению систем метаболизма.

Действие гормона на активность работы сердца у трех исследованных поколений проявлялось только в первой половине опыта и имело ингибирующий характер. Следовавшие за этим периоды стимуляции были непродолжительными. Есть данные о прямом воздействии преднизолона на сердечную мышцу позвоночных. Накапливаясь в ней, гормон увеличивал сократимость миокарда, повышал артериальное давление и в целом служил кардиостимулятором [15]. У ракообразных частота и амплитуда сердечных сокращений находятся под регулирующим действием нейроэндокринного перикардального органа, также стимулирующего работу сердца [6].

В качестве вероятного механизма угнетающего действия преднизолона на величину ЧСС у дафний можно предположить его способность включаться в общий сложный механизм эндокринной регуляции, что ведет к резкому изменению гормонального гомеостаза. Это изменение проявляется в нарушении нормального функционирования разных систем организма, включая кровеносную.

Подтверждением способности гидрокортизона включаться в регуляцию процессов жизнедеятельности у беспозвоночных животных могут быть данные, полученные нами ранее. Так, у планарий гидрокортизон выраженно стимулировал скорость регенерации [16]. У брюхоногих моллюсков он менял скорость прохождения начальных стадий эмбриогенеза, сокращая в результате общее время, необходимое для развития эмбрионов [17]. Динамика гормона в жизненном цикле двустворчатых и головоногих моллюсков позволяет говорить о его участии в регуляции процессов гаметогенеза [18; 19]. Увеличение уровня этого гормона, обнаруженное у некоторых видов двустворок, живущих в условиях стресса, может быть свидетельством включения его в реализацию процессов адаптации у моллюсков [10; 18].

Наличие у дафний комплекса выраженных ответных реакций на введение экзогенного преднизолона свидетельствует о высокой гормончувствительности этого вида. Изменения характера линейного роста, репродуктивной и сердечной активностей отражают характер и степень воздействия препарата на выбранные тест-функции. Можно предположить, что внесение дополнительных доз препарата в организм дафний приводит к нарушению гормонального гомеостаза и, как следствие, нормальной реализации основных функций организма. Все это позволяет предложить *Daphnia magna* в качестве тест-объекта для оценки эндокринных нарушений у гидробионтов.

Список литературы

1. Ezratty V. L'hypothese des perturbateurs endocriniens: Sensationnalisme ou science // Energ.-sante. 1998. Vol. 9, N 2. P. 167–176.



2. *Dodson S., Shurin I., Girvin K.* Daphnia reproductive bioassay for testing toxicity of aqueous samples and presence of an endocrine disrupter // Wisconsin Alum. Research Foundation. 2000. №8. P. 76–84.
3. *Полунина Ю.Ю.* Сообщество ветвистоусых ракообразных в специальных условиях эстуария : автореф. ... канд. биол. наук. Калининград, 2006.
4. *Баранов В.Г.* Физиология эндокринной системы. Л., 1979.
5. *Fingerman M., Nagabhushanam R., Sarojini K.* Vertebrate-type hormones in crustaceans: localization, identification and functional signification // Zool. Sci. 1993. Vol. 10, №1. P. 13–29.
6. *Проссер Л.* Сравнительная физиология животных. М., 1978. Т. 3.
7. *Rene L.* The endocrinology of invertebrates // Ecotoxicology. 2000. N 1–2. P. 41–57.
8. *Чибисова Н.В.* Динамика стероидных гормонов на отдельных этапах онтогенеза речных раков : автореф. ... канд. биол. наук. Л., 1989.
9. *Sumtavielle T., Rocha M., Ribeiro et al.* In vitro metabolism of steroid hormones by ovary and hepatopancreas of the crustacean Penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus* // Sci. mar. 2003. Vol. 67, №3. P. 299–306.
10. *Никитина С.М.* Стероидные гормоны у беспозвоночных животных. Л., 1982.
11. *Кудикина Н.П.* Особенности ответных реакций организма ракообразных на экзогенные эндокринные соединения // Тезисы докладов VIII съезда гидробиологического общества РАН. Калининград, 2001. Т. 1. С. 18–22.
12. *Baldwin W., Milam D., Leblanc G.* Physiological and biochemical perturbation in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental diethylstilbestrol // Environ. Toxicol. and chem. 1996. №3. P. 945–952.
13. *Теппермен Д., Теппермен Х.* Физиология обмена веществ и эндокринной системы М., 1989.
14. *Zaffagnini F.* Reproduction in *Daphnia* // Mem. Ist. ital. idrobiol. «Dott. M. Marchi». 1987. №45. P. 245–285.
15. *Колпаков М.Г.* Механизмы кортикостероидной регуляции функций организма. Новосибирск, 1978.
16. *Кудикина Н.П.* Влияние экзогенных гормональных соединений на процесс регенерации у плоских червей // Вестник Российского государственного университета им. И. Канта. 2012. Вып. 7. С. 84–91.
17. *Kudikina N.P.* Effect of Hormonal Compounds of Embryogenesis of the Pond Snail *Lymnaea stagnalis* (L., 1758) // Journal of Developmental Biology. 2011. Vol. 42, №3. P. 179–184.
18. *Кудикина Н.П.* Стероидные гормоны в жизненном цикле двустворчатых моллюсков. // Вестник Российского государственного университета им. И. Канта. 2008. Вып. 7. С. 79–86.
19. *Кудикина Н.П.* Экологические аспекты динамики стероидных гормонов в репродуктивном цикле морских двустворчатых, брюхоногих и головоногих моллюсков // Уч. записки Казанского ун-та. 2007. Т. 9, №3. С. 214–224.

Об авторе

Наталья Петровна Кудикина – канд. биол. наук, доц., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.
E-mail: knatpost@mail.ru

About the author

Dr Natalya P. Kudikina, Associate Professor, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.
E-mail: knatpost@mail.ru