

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ DAPHNIA MAGNA В ЧИСТЫХ И ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ ВОДАХ

Олькова А.С.¹, Краснов М.С.², Ямскова В.П.³, Ямсков И.А.²

¹ ФГБОУ ВПО Вятский государственный гуманитарный университет, Киров, Россия (610005 Россия, г. Киров, ул. Красноармейская, 26), e-mail: morgan-abend@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия (119991 ГСП-1, В-334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 28), e-mail: embrmsk@mail.ru

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия (119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, 26), e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

Исследована биологическая активность двух биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови крупного рогатого скота и чистотела, принадлежащих к новой группе мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, в отношении рачков *Daphnia magna* St. Показано положительное влияние сывороточного биорегулятора на созревание, трофическую активность и плодовитость *D. magna*, а также его протекторное действие при тестировании витальной дозы ионов меди и летальной концентрации хрома. Растительный биорегулятор из *Chelidonium majus* задерживает развитие дафний, угнетает их плодовитость, однако при внешнем химическом воздействии способен поддерживать жизненные функции. Подтверждено видонеспецифическое действие исследуемых биорегуляторов. Полученные в работе данные по протекторному действию пептидных биорегуляторов для гидробионтов можно использовать как фундаментальные основы методов ремедиации водных объектов.

Ключевые слова: биорегуляторы, биотестирование, *Daphnia magna*, протекторное действие, трофическая активность, двигательная активность, плодовитость, токсичность, тяжелые металлы.

THE INFLUENCE OF THE NEW PEPTIDE BIOREGULATORS ON THE ACTIVITY DAPHNIA MAGNA IN CLEAN AND HEAVY METAL POLLUTED WATERS

Olkova A.S.¹, Krasnov M.S.², Yamskova V.P.³, Yamskov I.A.²

¹ Federal public budgetary educational institution of higher education «Vyatka state university of humanities», Kirov, Russia, e-mail: morgan-abend@mail.ru;

² A. N. Nesmeyanov Institute of organoelement compounds of Russian Academy of Science, Moscow, Russia, e-mail: embrmsk@mail.ru;

³ N. K. Koltsov Institute of developmental biology of Russian Academy of Science, Moscow, Russia e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

The biological activity of two bioregulators isolated from blood serum of cattle and celandine, belonging to the new group membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators, in relation to crustaceans *Daphnia magna* St. The positive effect of serum on the maturation of the bioregulator, trophic activity and fecundity of *D. magna*, and its protective effect against vital doses of copper ions and lethal concentration of chromium. The plant bioregulator of *Chelidonium majus* retards the development of *Daphnia*, inhibits their fertility, but under external chemical exposure capable of supporting life functions. Confirmed not species-specific action studied bioregulators. The data obtained on the protective effect of the studied bioregulators to aquatic organisms can be used as the fundamentals of the methods remediation of water objects.

Keywords: bioregulators, bioassay, *Daphnia magna*, protective action, trophic, locomotion activity, fertility, toxicity, heavy metals.

Исследованию биологически активных веществ и биопротекторов учеными всего мира уделяется огромное внимание. Это связано с тем, что они чаще всего полифункциональны, безопасны и эффективны. Такие группы биопротекторов, как витамины, натуральные и синтетические антиоксиданты, аминокислоты, уже активно

используются в медицине, ветеринарии, природопользовании. Сотрудниками Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова открыты и исследуются свойства новых пептидно-белковых биорегуляторов, выделяемых из тканей животных и растений. Это недостаточно исследованная и в то же время перспективная группа биорегуляторов с доказанным репаративным и протекторным действием на различные ткани и органы [5].

В природоохранной практике имеется острая необходимость разработки фундаментальных основ биоремедиационных мероприятий водных объектов. Одним из перспективных и одновременно новым направлением в этой сфере является поиск и исследование природных защитных механизмов от негативных факторов, способов их активизации. Представляется актуальным исследование протекторных свойств пептидных биорегуляторов, действие которых ранее не было оценено для мезо- и микрогидробинтов. Полученные научные данные позволят заложить основы методов ремедиации водных объектов.

Цель исследования – изучить действие новых биорегуляторов, выделенных из животных и растений, на низших ракообразных *Daphnia magna* St., а также их протекторные свойства при токсическом действии тяжелых металлов.

Материал и методы исследования. Исследовали действие биорегуляторов (БР), выделенных из сыворотки крови и листьев чистотела. Для выделения биорегулятора использовали сыворотку крови (ПанЭко, Россия). Свежесобранные нарезанные листья чистотела помещали в экстрагирующий раствор ($2,06 \times 10^{-2}$ М NH_4NO_3 ; $1,88 \times 10^{-2}$ М KNO_3 ; 3×10^{-3} М $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $1,5 \times 10^{-3}$ М $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1,25 \times 10^{-3}$ М KH_2PO_4) на 4-5 часов при $+4^\circ\text{C}$ (на 500 г зеленой массы использовали 1000 мл р-ра). Полученный экстракт отфильтровывали через несколько слоев марли, затем центрифугировали при 3000 г в течение 30 мин. Образовавшийся осадок отделяли от основного раствора, который далее очищали методом высаливания белков. Для этого к сыворотке крови или экстракту чистотела добавляли при перемешивании сульфат аммония (780 г/л) и азид натрия (0,1 мг/), образовавшуюся суспензию оставляли на 5 суток при 4°C , центрифугировали (12000 г; 30 мин), супернатанты и осадки собирали отдельно и диализовали против воды до полного удаления следов соли. Фракции супернатантов концентрировали в вакуумном роторном испарителе при 40°C и далее разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В полученных фракциях определяли мембранотропную активность.

Далее проводили биотестирование чистых и загрязненных тяжелыми металлами модельных растворов по смертности и плодовитости *D. magna* в соответствии с аттестованной методикой [4]: повторность трехкратная, экспозиция 24 дня в условиях климатостатирования, смена модельных растворов осуществлялась каждые 5 суток. Также

оценивали сублетальные эффекты: изменение трофической и двигательной активностей по авторским методикам [1]. В модельные растворы ежедневно вводили добавки соответствующих БР, выделенных из сыворотки крови (БРС) или чистотела (БРЧ) в конечной концентрации действующего вещества 10^{-12} мг/мл. Добавки препаратов вводились как в чистую водную среду, так и в загрязненную тяжелыми металлами. Моделировалось загрязнение соединениями меди и хрома. Тестировалась витальная концентрация ионов меди $0,039$ мг/дм³, что соответствует $0,01$ ПДК для питьевых вод или 10 ПДК для вод рыбохозяйственных водоемов. Кроме того, исследовалось протекторное действие БР на фоне летальной концентрации бихромата калия – $0,57 \cdot 10^{-4}$ мг/дм³ в расчете на ион хрома. Контрольной средой и основой для приготовления всех тестируемых растворов являлась артезианская вода питьевого качества без добавок.

Результаты исследования и их обсуждение. Через сутки после начала эксперимента действие БР отразилось на двигательной активности рачков. БРЧ угнетал подвижность дафний на 15% . БРС через сутки не оказывал значимого действия на активность. Однако в загрязненной модельной среде оба БР оказывали протекторное действие, приближая двигательную активность к контрольным показателям: под воздействием меди двигательная активность снизилась на 35% к контролю, тогда как на фоне БРС только на 18% , на фоне БРЧ на 16% .

На пятые сутки эксперимента, в момент смены тестируемых сред, оценивали двигательную и трофическую активности (табл. 1).

Таблица 1

Влияние биорегуляторов животного и растительного происхождения на двигательную и трофическую активность *D. magna*

Вариант	Двигательная активность, % к контролю	Трофическая активность, % к контролю
Контроль + БРС	+9,1	+26,7*
Контроль + БРЧ	+21,7*	-8,8
0,01 ПДК п. (Cu ²⁺)	-12*	+73,3*
0,01 ПДК п. (Cu ²⁺) + БРС	-33,6*	+42,2*
0,01 ПДК п. (Cu ²⁺) + БРЧ	-6,1	+2,2

Примечание: * – отличия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$).

По данным таблицы 1 видим, что первоначальная тенденция угнетения БРЧ двигательной активности сменилась на стимуляцию, в то же время лишь в данном опытном варианте наблюдали снижение пищевой активности. Впоследствии, к концу эксперимента, именно в этом варианте отметили тенденцию снижения плодовитости.

Закономерная связь между трофической активностью и последующей плодовитостью ярко проявляется под воздействием БРС. Добавка в чистую среду БРС увеличивала пищевую активность на четверть, приводя также к достоверной стимуляции рождаемости молоди. Совместное действие препарата и меди привело к максимальным показателям плодовитости в опыте.

Действие меди проявилось в снижении двигательной активности рачков. При этом значительное увеличение трофической активности в загрязненной среде, возможно, является компенсаторным механизмом в ответ на стресс-фактор. При добавке БР показатель пищевой активности несколько приближается к контрольным значениям.

В процессе дальнейшего биотестирования было выявлено, что БР оказывают воздействие на плодовитость дафний при добавке препаратов в чистую водную среду, а также изменяют ответные реакции организмов на тяжелые металлы. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние биорегуляторов животного и растительного происхождения на время созревания и плодовитость *D. magna*

Вариант	Время первого вымета молоди, сутки	Плодовитость, шт./1 взрослую особь	Наличие эффекта по сравнению с контролем*
Контроль (без добавок)	8	9,1±1,4	-
Контроль + БРС	8	12,1±1,3	Достоверная стимуляция (p<0,05)
Контроль + БРЧ	10	7,9±1,5	Тенденция угнетения (p>0,05)
0,01 ПДК п. (Cu ²⁺)	10	11,0±0,7	Тенденция стимуляции (p>0,05)
0,01 ПДК п. (Cu ²⁺) + БРС	10	12,6±1,2	Достоверная стимуляция (p<0,05)
0,01 ПДК п. (Cu ²⁺) + БРЧ	10	12,7±1,1	Достоверная стимуляция (p<0,05)

Примечание: * – наличие эффекта оценивалось с помощью критерия достоверности Стьюдента.

БРС оказывал положительный эффект на развитие особей *D. magna*. Наблюдалось одновременное появление выводковых камер у всех рачков модельных популяций на 6 день эксперимента, в то время как у рачков в контрольной среде без добавок такой синхронности не было. В результате, несмотря на одновременное появление первой молоди в контрольном и опытном варианте, количество молоди при воздействии БРС на 10 день эксперимента превышало контрольные показатели в 1,7 раза. Данная тенденция сохранялась в течение всего опыта, и в заключительный 24 день экспозиции констатировали математически

значимое увеличение плодовитости по сравнению с контролем. Однако первоначальная разница в плодовитости несколько нивелировалась и составила 1,3 раза.

БРЧ, напротив, оказывал тормозящий эффект на основные показатели жизнедеятельности рачков. Время первого вымета молоди под его воздействием сдвинулось на 2 дня, что является существенным при относительно коротком жизненном цикле *D. magna* (наиболее активный период до 3,5 месяцев). Сравнивая плодовитость в первый пик рождаемости молоди, на 10 день, установили угнетение по сравнению с контролем в 2,8 раз, а по сравнению с вариантом с БРС в 4,7 раз. К завершению эксперимента отличия уже не были столь существенными. Сохранилась общая тенденция к угнетению плодовитости рачков: отличия по сравнению с контролем оказались недостоверны, в то же время по сравнению с действием БРС растительный биорегулятор из чистотела снижал способность к размножению достоверно.

При загрязнении тестируемой среды сульфатом меди в относительно низких концентрациях (0,01 ПДК для питьевых вод) выявлена тенденция увеличения плодовитости дафний. Это явление закономерно, поскольку медь является необходимым всем живым организмам микроэлементом, являющимся активным центром многих ферментов [2]. Для ряда тяжелых металлов, в том числе меди, показано, что действие витальных концентраций начинается со стимуляции различных функций организма [6]. Несмотря на общее стимулирующее влияние меди на плодовитость рачков, также выявлены признаки развивающегося стресса. Например, по показателю первого появления молоди отметили отставание, общее количество молоди в первых приплодах было минимальным, наблюдали уменьшение размеров тела у отдельных особей. Указанные действия меди отмечали как на фоне препаратов, так и без них.

Тем не менее БР оказывали действие в загрязненной среде. Например, без исследуемых препаратов загрязнение меди вызвало отсутствие первого пика рождаемости, а во второй половине эксперимента, на 17 день, наблюдался всплеск плодовитости до 50 новорожденных особей на модельную популяцию. Данный факт нивелировал первоначальное отставание в плодовитости и даже выразился в тенденции ее стимуляции. В то же время и сывороточный, и растительный БР начали оказывать заметное протекторное действие уже в первой половине опыта, увеличивая рождаемость до 25 %, по сравнению с модельной загрязненной средой. Таким образом, под действием препаратов БРС и БРЧ сформировалось два пика массового появления молоди, подобно динамике рождаемости в контрольном незагрязненном варианте. Из чего можно сделать вывод о протекторном действии как сывороточного, так и растительного БР.

Угнетающее действие БРЧ претерпело инверсию в сторону стимуляции. Вероятно, это связано с тем, что БРЧ способен прекращать деление и развитие патологических клеток, появляющихся при токсическом действии. В исследованиях с препаратом из чистотела на лабораторных мышках показана его способность на 90–95 % блокировать рост перевивной лимфосаркомы у мышей *in vivo*.

Кроме прямого действия биорегуляторов и их влияния на проявление токсических эффектов меди, была изучена биологическая активность препаратов БРС и БРЧ на фоне летальной концентрации бихромата калия (табл. 3).

Таблица 3

Влияние биорегуляторов растительного и животного происхождения на динамику гибели *D. magna* при воздействии дихромата калия (10 ПДК_{р.-х.} по хрому)

Вариант	Смертность, %				
	День эксперимента				
	5	7	10	15	23
Контроль	0	0	0	0	0
Токсикант	0	10	56,7	66,7	96,7
Токсикант + БРС	0	9	50	56,7	96,7
Токсикант + БРЧ	0	66,7	76,7	76,7	100

В контрольной среде без моделируемого загрязнения и в первые 5 суток в опытных вариантах гибели дафний не было. На 6–7 день эксперимента количество живых рачков стало резко сокращаться. Наиболее неблагоприятная ситуация наблюдалась с добавкой БРЧ, где смертность на 7 день превысила критические 50 %. БРС оказывал слабое протекторное действие, продлевающее срок жизни дафний в сильно токсичной среде. Отметим, что с добавлением БРС морфофункциональные показатели живых дафний были значительно лучше: размеры тела приближались к нормальным, окраска тела сохранялась, наблюдалась способность к размножению.

Выявленные закономерности в целом согласуются с научными данными, полученными ранее о действии изучаемых препаратов. БРС обладает широким спектром действия, способствуя восстановлению поврежденных тканей. Показана его протекторная и регенеративная активность в отношении костной, хрящевой ткани, кожи, роговицы глаза, восстановлению эпителия и других тканей органов желудочно-кишечного тракта [3, 5, 7].

Растительный БР, выделенный из чистотела, недостаточно изучен. Показана его активность в отношении опухолевых клеток. Вероятно, это стало предпосылкой его положительного влияния на плодовитость низших ракообразных в загрязненной среде.

Заключение. Изучаемые БР, безусловно, являются перспективными биологически активными веществами. Многие из них имеют широкий спектр действия за счет

восстановления биохимической нормы внутриклеточных процессов. Видонеспецифическое действие позволяет максимально увеличивать сферы их применения.

В данной работе было показано, что БР, выделенный из сыворотки крови крупного рогатого скота, обладает положительным действием в отношении низших ракообразных *Daphnia magna* St. При его добавке в чистую культивационную воду повышается трофическая активность дафний и их плодовитость. Выявленная стимуляция не завышена, а, значит, не носит стрессорного, истощающего характера для модельных популяций. Протекторное действие БРС проявилось в отношении витальной дозы ионов меди: пики рождаемости соответствовали динамике размножения *D. magna* в контрольной среде, в совокупности с эссенциальным действием невысокой концентрации меди наблюдалась стимуляция плодовитости. Однако при исследовании летального действия токсиканта на дафний сывороточный биорегулятор проявил лишь слабую тенденцию протекторного действия. Из этого можно сделать вывод, что протекторные свойства биорегулятора наиболее полно могут быть реализованы при риске нерегулярных загрязнений, или наличии природных геохимических аномалий с повышенным содержанием ряда микроэлементов, которым свойственна нежелательная биоаккумуляция.

Свойства растительного биорегулятора, выделенного из чистотела *Chelidonium majus*, еще предстоит раскрыть. Показана его двойственная природа в отношении *D. magna*: тормозящее действие при добавке в чистую водную среду, но при этом стимулирующее действие в комплексе с витальными дозами микроэлементов (на примере меди).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 15-34-5038715).

Список литературы

1. Олькова А.С. Поиск информативных тест-функций *Daphnia magna* при биотестировании компонентов окружающей среды // «Биосистема: от теории к практике». Сборник тезисов. – Пущино, 2013. – С. 92-94.
2. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 960 с.
3. Рыбакова Е.Ю., Краснов М.С., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Влияние биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и костной ткани млекопитающих, на состояние регенератов хвостов тритонов при роллерном органотипическом культивировании *in vitro* // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5. – Ч. 2. – С. 283-289.

4. ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. – М.: АКВАРОС, 2007. – 51 с.
5. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. – Saarbrucken: Lambert Academic Publishing, 2012. – P. 136.
6. Abba M., De Luca J.C., Mattioli G., Zaccardi E., Dulout F.N. Clastogenic effect of copper deficiency in cattle // *Mutat Res.* – 2000. – Mar 3. – 466(1). – P. 51-55.
7. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A. Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 2. Tissue localization and role in wound healing // *Biochemical Physics Frontal Research* / Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov. – NY: Nova Science Publishers Inc, 2007. – Pp. 71-78.

Рецензенты:

Шарова Н.П., д.б.н., заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией биохимии процессов онтогенеза ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва;

Куликов А.М., д.б.н., заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией эволюционной генетики развития ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва.