

Особенности влияния растворов малых и сверхмалых концентраций солей меди и свинца на выживаемость дафний (*Daphnia magna*)

© 2009. С.М. Захаров¹, м.н.с., Д.Е. Иванов¹, д.б.н., в.н.с.,
Н.В. Емельянова¹, к.б.н., зав. лабораторией, И.Н. Ларин¹, к.б.н., зав. отделом,
В.Н. Чупис¹, д.ф.-м.н., директор, Т.И. Губина², д.б.н., зав. кафедрой,
¹ ФГУ ГосНИИ промышленной экологии,
² Саратовский государственный технический университет,
e-mail: info@sar-ecoinst.org, Biolab-info@mail.ru

В настоящей работе изучено влияние различных концентраций солей меди и свинца (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} , 10^{-20} , 10^{-22} , 10^{-24} мг/мл) на выживаемость дафний (*Daphnia magna*). Установлено, что эффект сверхнизких концентраций обнаружен как для CuSO_4 , так и для $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ и проявляется при концентрации солей 10^{-18} мг/мл. При дальнейшем выдерживании приготовленных растворов до 12 суток видимых изменений эффекта сверхнизких концентраций не наблюдается. После 12 суток происходит смещение токсического эффекта в сторону меньших значений концентраций. Изучено влияние температуры выдерживания приготовленных растворов (-4°C , $+18^\circ\text{C}$, $+28,5^\circ\text{C}$) на тест-объект. Показано, что различные температуры способствуют потере эффекта сверхмалых концентраций.

The influence of copper and lead salts in different concentrations (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} , 10^{-20} , 10^{-22} , 10^{-24} milligram/milliliter) on daphnia (*Daphnia magna*) survival probability is considered. It was stated that the effect of super-low concentration is shown both for CuSO_4 and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and it is observed with salt-concentration of 10^{-18} milligram/milliliter. If the solution is kept further up to 12 days no changes of super-low concentration effect are observed. After 12 days there takes place change of toxic effect - concentration gets lower. The influence of the solutions temperature (-4°C , $+18^\circ\text{C}$, $+28,5^\circ\text{C}$) on the test-object was considered. It is stated that different temperatures contribute to the loss of super-low concentration effect.

Ключевые слова: сверхмалые дозы, тест-объекты, тяжёлые металлы

Введение

Эффекты действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах привлекают значительный интерес исследователей в области экологии и биохимии. Рабочие концентрации целого ряда внутренних биорегуляторов, например, пептидов и собственных гормонов, часто находятся в интервале 10^{-9} – 10^{-12} моль/л и даже менее. Эффективные дозы некоторых признанных лекарственных препаратов и токсинов значительно ниже 10^{-12} моль на 1 кг массы тела [1 – 5].

На основании многочисленных данных за действующие сверхмалые концентрации биологически активных веществ можно принимать интервал концентраций в 10^{-12} – 10^{-20} моль/л. Действие концентраций менее 10^{-12} М ещё можно как-то объяснить на основе законов традиционной лиганд-рецепторной кинетики, а при концентрациях менее 10^{-19} моль/л в экспериментальном объёме (порядка миллилитра) может не быть ни одной молекулы действующего вещества.

Соединения меди и свинца являются достаточно распространёнными веществами, загрязняющими окружающую среду, которые образуются чаще всего в процессе промышленного антропогенного воздействия. В связи с этим вполне актуальны исследования их содержания в природных средах и оценка влияния этих загрязняющих веществ на различные живые организмы.

Дафнии (*Daphnia magna*) являются тест-объектами, которые широко используются в практике биомониторинга состояния окружающей среды, однако воздействие сверхнизких концентраций меди и свинца на дафний в настоящее время мало изучено.

В представленной работе приведены результаты исследования влияния различных концентраций солей меди и свинца на выживаемость дафний (*Daphnia magna*).

Методы исследования

В ходе экспериментов исследовалось воздействие на дафний растворов сульфата меди и нитрата свинца в концентрациях: 10^{-3} , 10^{-6} ,

10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} , 10^{-20} , 10^{-22} , 10^{-24} мг/мл. Эксперименты проводились при постоянной температуре 20 ± 2 °C.

Растворы готовились из исходных растворов $Pb(NO_3)_2$ и $CuSO_4$ с концентрацией 0,001 мг/мл методом последовательных разбавлений. Готовили следующие концентрации этих растворов: 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} , 10^{-20} , 10^{-22} , 10^{-24} мг/мл. Приготовление растворов осуществлялось в соответствии с методикой E. Davenas, F. Beauvais, J. Arnara [6].

Смертность дафний оценивали по методике Н.С. Жмур [7]. Для определения острой токсичности исследуемых концентраций рассчитывали процент погибших в тестируемой воде дафний (A, %) по сравнению с контролем по следующей формуле:

$$A = \frac{X_K - X_T}{X_K} \cdot 100 \%,$$

где X_K — количество выживших дафний в контроле; X_T — количество выживших дафний в тестируемой воде.

При $A \leq 10\%$ тестируемая вода не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления). При $A \geq 50\%$ тестируемая вода оказывает острое токсическое действие.

Во второй серии эксперимента, растворы данных концентраций выдерживали параллельно при комнатной и при заданных температурах (-4 °C, $+18$ °C и $+28,5$ °C) в течение 24 ч. После чего проводили биотестирование на дафниях по методике Н. С. Жмур.

По полученным результатам строили графики зависимости выживаемости дафний от времени с момента приготовления растворов и их выдерживания при заданных температурах.

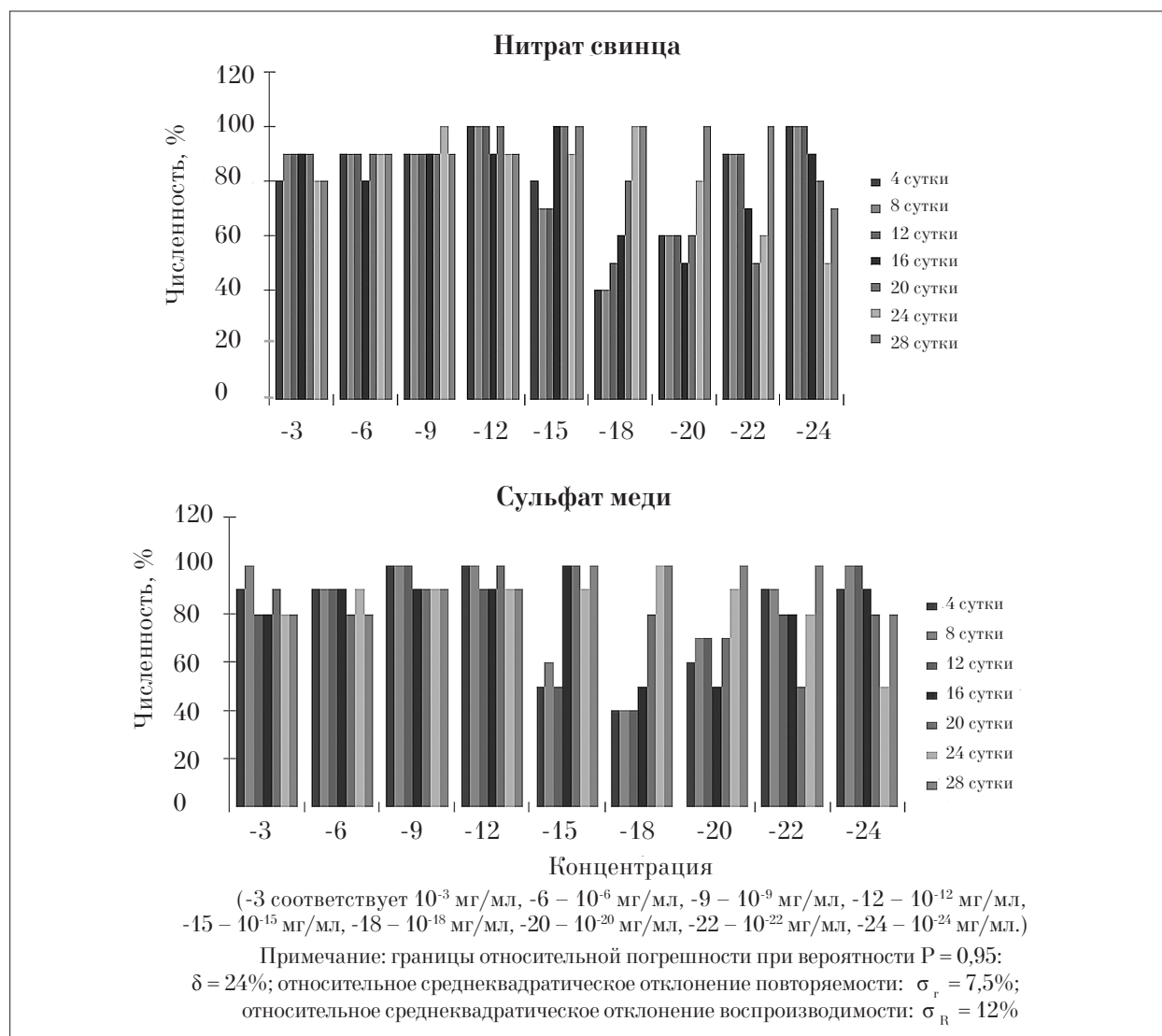


Рис. 1. Влияние времени выдерживания нитрата свинца и сульфата меди на выживаемость дафний (*Daphnia magna*)

Результаты и обсуждение

1. Влияние времени выдерживания приготовленных растворов солей на выживаемость *Daphnia magna* (время от момента приготовления растворов до проведения биотестирования на дафниях).

В ходе экспериментов исследовалось воздействие малых и сверхмалых концентраций растворов сульфата меди и нитрата свинца на выживаемость *Daphnia magna*. Продолжительность эксперимента – 29 дней. Биотестирование проводилось на следующие сутки после приготовления растворов. Полученные результаты в виде графиков представлены на рисунке 1. Установлено, что наибольший эффект сверхнизких концентраций (СНК) обнаружен как для CuSO_4 , так и для $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в разведении солей 10^{-18} мг/мл. При выдерживании приготовленных растворов до 12-ти суток видимых изменений эффекта сверхнизких концентраций не наблюдается. После 12-ти суток происходит смещение токсического эффекта в сторону меньших значений концентраций, т. е. на протяжении 12-ти суток максимальный токсический эффект для этих солей был на отметке 10^{-18} мг/мл, затем на 16-е сутки токсический эффект сместился на отметку 10^{-20} мг/мл, а на 20-е – 10^{-22} мг/мл. Наблюдаемую неустойчивость биоэффекта можно объяснить тем, что при сверхнизких концентрациях число молекул вещества в образце мало или вообще отсутствует, вследствие чего становятся заметней флуктуации числа молекул около клеточных мишеней [8]. Наблюдаемые процессы могут быть обусловлены и изменениями структурной организации молекул воды.

2. Влияние температуры выдерживания приготовленных растворов солей на выживаемость *Daphnia magna*.

Следующим этапом наших исследований было изучение влияния температуры выдерживания приготовленных растворов на тест-объект. Растворы всех выше приготовленных концентраций выдерживались в течение суток при температурах -4°C , $+18^\circ\text{C}$ и $+28,5^\circ\text{C}$. Затем температура доводилась до комнатной температуры ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), и проводилось биотестирование. Показано, что различные температуры, при которых выдерживались растворы солей, способствуют потере эффекта сверхмалых концентраций (рис. 2).

Установлено, что при выдерживании растворов CuSO_4 различной концентрации при температуре -4°C , токсическое действие соли

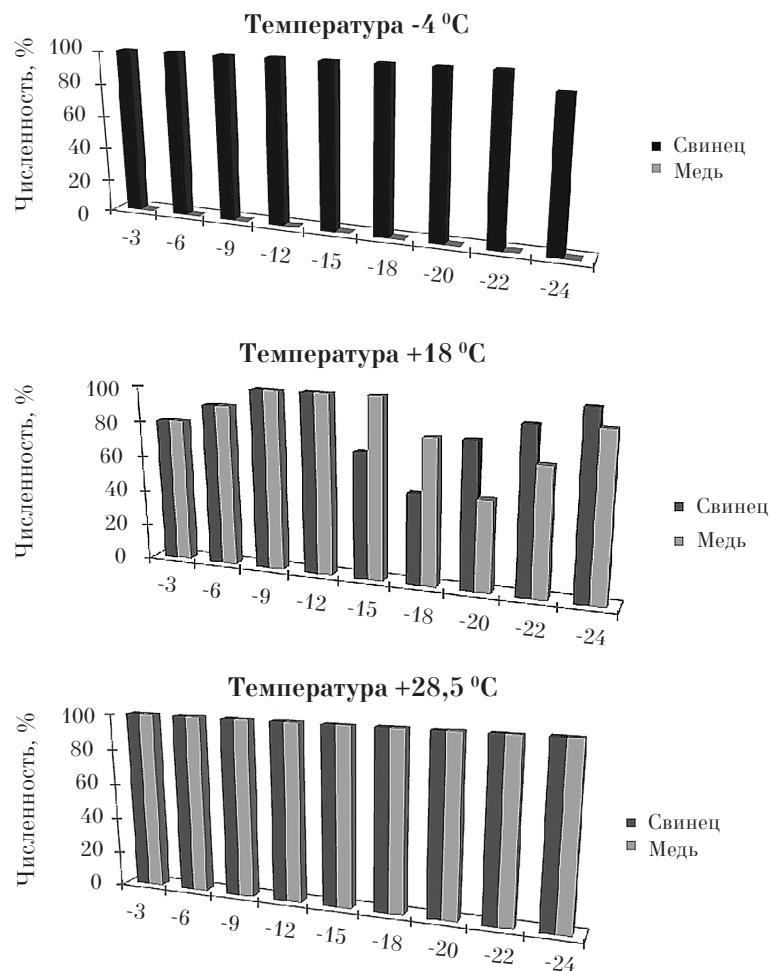
проявляется при всех концентрациях в равной мере (100% гибель), а при температуре $+28,5^\circ\text{C}$ токсического эффекта данной соли не наблюдается. Выдерживание растворов соли $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ при экстремальных температурах приводит к потере токсичности данных растворов. Что касается выдерживания растворов обеих солей при температуре $+18^\circ\text{C}$, то наблюдаемые при 22°C эффекты малых доз сохранились в тех же значениях для $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ и незначительно сместились (до 10^{-20}) для CuSO_4 (рис. 2).

Характерными особенностями действия веществ в малых и сверхмалых дозах являются сложный характер дозовой зависимости и действие сверхмалой концентрации на фоне большой концентрации того же вещества, присутствующего в объекте воздействия. Можно предположить, что действия веществ в сверхмалых дозах (СМД) опосредуются специфическими (рецепторными) взаимодействиями, а если эффект проявляется при больших концентрациях, то он определяется либо рецепторами иного типа, чем в случае СМД, либо неспецифическими реакциями (окислительно-восстановительными и др.). Возможно, что эффекты СМД естественным образом связаны с адаптационными явлениями, поскольку адаптация приводит к тому, что система может реагировать не на концентрацию действующего вещества, а на изменение концентрации, в том числе на введение малых и сверхмалых доз [9, 10, 11].

Однако общепринятой точки зрения на механизмы и процессы, лежащие в основе эффектов СМД, пока нет. Явление действия столь низких концентраций пытаются объяснить с помощью различных гипотез.

Согласно одной из них – эффект СМД обусловлен концентрированием действующего вещества-эффектора в определённых тканях и клетках [12]. В результате количество вещества в клетках, на которые направлено его действие, может оказаться на 2-3 порядка выше исходной концентрации [13].

В рамках другой гипотезы – действие веществ в сверхмалых концентрациях связано с наличием исключительно высокоэффективных систем усиления сигнала, которые формируются за счёт протекания каскадных процессов, при этом на каждом этапе, на его «выходе» активных молекул больше, чем на «входе» [14, 15]. Следует отметить, что усиление сигнала возможно не только путём изменения концентрации вторичных мессенджеров, но также и за счёт активации синтеза белков, участвующих в передаче сигнала [14, 15, 16].



Концентрация
 (-3 соответствует 10^{-3} мг/мл, -6 – 10^{-6} мг/мл, -9 – 10^{-9} мг/мл, -12 – 10^{-12} мг/мл,
 -15 – 10^{-15} мг/мл, -18 – 10^{-18} мг/мл, -20 – 10^{-20} мг/мл, -22 – 10^{-22} мг/мл, -24 – 10^{-24} мг/мл.)
 Примечание: границы относительной погрешности при вероятности $P = 0,95$:
 $\delta = 24\%$; относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости: $\sigma_r = 7,5\%$;
 относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости: $\sigma_R = 12\%$

Рис. 2. Влияние температуры выдерживания приготовленных растворов солей на выживаемость дафний (*Daphnia magna*)

Наблюдаемую во многих случаях неустойчивость биоэффекта по величине и знаку можно объяснить также тем, что при сверхнизких концентрациях число молекул вещества в образце мало, вследствие чего становятся заметней флуктуации числа молекул около клеточных мишеней.

Однако, несмотря на разнообразие гипотез, объясняющих действие СМД, существуют общие закономерности действия СНК, что даёт возможность рассматривать данное явление с единой точки зрения. Повидимому, это связано с тем, что все процессы протекают в водной среде и обусловлены изменениями структурной организации молекул воды.

Литература

1. Бурлакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз // Вестник РАН. 1994. Т. 64. № 5. С. 425-431.
2. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // Российский химический журнал. 1999. Т. XLIII. Вып. 5. С. 3-11.
3. Бурлакова Е.Б. Сверхмалые дозы – большая загадка природы // Экология и жизнь. 2000. № 2. С. 38.
4. Safrit J., Tsuchitani T., Zighuboim J., Bonavida B. Ultra-Low Doses. / Ed. by C. Doutrempuich. Univ. Bordeaux. France. 1991. P. 27.
5. Davis J.M., Svendsgaard D.J. U-Shaped Dose Response Curves, Tox. and Environ. // Toxic and environmental health. 1990. V. 30. P. 71.

6. E. Davenas, F. Beauvais, J. Arnara. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE // *Nature*. 1988. V. 333. №. 6176. P. 816-818.
7. Жмур Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР. 1.39.2001.00283. М. Акварос. 32 с.
8. Faith R.E., Liang H.J., Murgio A.J., Plotnikoff N.P. Neuroimmunomodulation with enkephalins: enhancement of human natural killer (NK) cell activity in vitro // *Clin Immunol. and Immunopathol.* 1984. V. 31. P. 412 – 418.
9. Zaitsev S.V., Khagai L.A., Kim B.B. Mechanisms ultramicroamount // *Immunol. Letters*. 1992. V. 335. P.114-116.
10. Efanov A.M., Koshkin A.A., Sazanov L.A., Borodulina O.I., Varfolomeev S.D., Zaitsev S.V. Inhibition of the respiratory burst in mouse macrophages by ultralow doses of an opioid peptide is consistent with a possible adaptation mechanism // *FEBS Lett.* 1994. V. 355. № 2. P. 114-116.
11. Sazanov L.A., Zaitsev S.V. Effect of superlow doses (10(-18)-10(-14) M) of biologically active substances: general rules, features, and possible mechanisms // *Biokhimiia*. 1992. P. 144-150.
12. Katz L.S., Marquis J.K. Modulation of central muscarinic receptor binding in vitro by ultralow levels of the organophosphate paraoxon // *Toxicol. Appl. Pharm.* 1989. V.101. P. 114 – 123.
13. Dubinin KV, Zakharova LA, Khagai LA, Zaitsev SV. Immunomodulating effect of met-enkephalin on different stages of lymphocyte proliferation induced with concanavalin A in vitro // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1994. P. 463-472.
14. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. М.: ФАИР Пресс, 1998. 716 с.
15. Zaitsev S.V., Il'ina A.D., Varfolomeev S.D. Research in Biochemical Kinetics. // N.Y.: Nova Science Publishers Inc, 1993. P.102 – 119.
16. Reibman J.J. Transforming Growth Factor-Messenger RNA and Protein in Murine Colitis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 6805.