МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ФОРМИРОВАНИЮ РЕФЕРЕНТНЫХ ГРУПП БЕНТОСНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ОЦЕНОК ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

С. В. Холодкевич, Т. В. Кузнецова, С. В. Сладкова, Г. П. Удалова, В. А. Любимцев

Учреждение Российской Академии наук Санкт-Петербургский Научно-исследовательский Центр экологической безопасности РАН, г. Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: kholodkevich@mail.ru

Введение

При проведении биомониторинговых или экотоксикологических исследований часто приходится сталкиваться с тем, что даже в группе однородных по размерно-весовым показателям животных, взятых из одной природной микропопуляции, могут наблюдаться значительные количественные различия их реакций на одни и те же воздействия. Обычно для токсикологических исследований применяют стандартные методы отбора животных одного вида, одной генетической линии, одного возраста и пола, сходных по морфометрическим характеристикам и без видимых повреждений. Однако, как показали наши исследования, такой подход является необходимым, но не достаточным. В результате многочисленных экспериментов на бентосных беспозвоночных: речных раках (*Astacus astacus, Pontastacus leptodactylus)* и моллюсках *(Mytilus edulis* L.*, Mytilus galloprovincialis* Lam., *Littorina littorea* L. и др.) нами установлено, что индивидуальные различия в ответах тест-животных, отобранных по указанным общепринятым показателям, могут достигать 40–50% по характеристикам кардиоактивности (ЧСС) и общему белку гемолимфы (Кузнецова и др., 2010).

Исходя из вышесказанного, весьма существенным представляется поиск методических подходов для выявления таких физиологических, биохимических или поведенческих показателей, которые наиболее полно отражали бы индивидуальные особенности животного, в частности состояние организма в целом, или функциональное состояние тестируемой системы, в частности сердечно-сосудистой.

Настоящая работа была посвящена поиску именно таких подходов с целью определения критериев отбора бентосных беспозвоночных и формирования референтных групп тест-организмов, функциональное состояние которых определено и однородно по своим физиологическим показателям. Это принципиально важно для получения в экотоксикологических исследованиях достоверных результатов, облегчения их интерпретации, а также для использования таких групп животных в биоэлектронных системах мониторинга контроля качества воды в реальном времени (Холодкевич, 2007).

Материалы и методы

В лабораторных условиях при контролируемых температуре и световом режиме проводили исследования на раках *Pontastacus leptodactylus* Esch, половозрелых самцах весом от 55 до 80 г. Перед экспериментами раков адаптировали к условиям содержания в течение 1–1,5 месяцев. Эксперименты на 2–3-х летних черноморских моллюсках *Mytilus galloprovincialis* Lam. размером 40–45 мм осуществляли *in situ* в летний период. Всех животных отбирали без явных признаков повреждений и заболеваний. У моллюсков обращали внимание на отсутствие повреждений раковины.

Первоначально об удовлетворительном функциональном состоянии раков судили по хорошо выраженной реакции опистотонуса (поднимание обеих клешней в ответ на тактильный или зрительный стимул), а у моллюсков – по защитной реакции быстрого закрытия створок при тактильном воздействии.

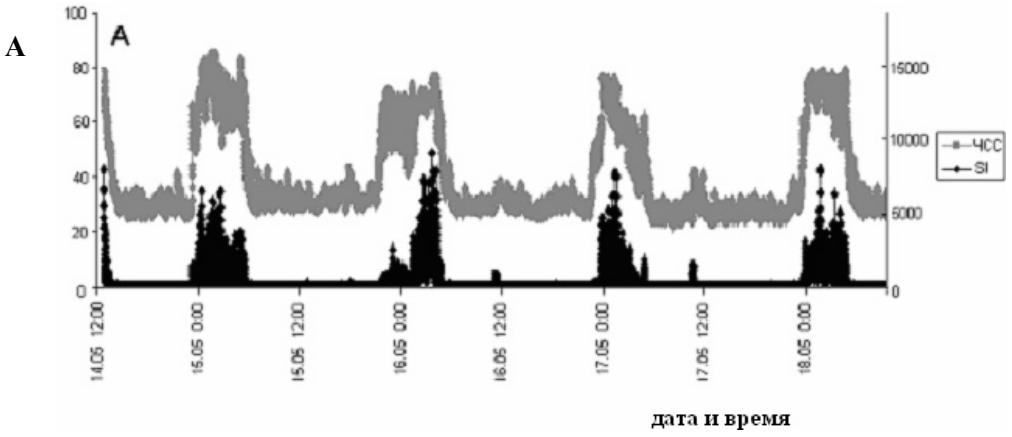
Кардиоритм тест-животных измеряли с помощью оригинального неинвазивного волоконно-оптического метода (Холодкевич и др., 2007; Kholodkevich et al., 2008). Хронотропные харак-

теристики кардиоактивности анализировали с использованием адаптированного для беспозвоночных животных метода вариационной пульсометрии (Kholodkevich et al., 2007, 2008). Разработанный 7-канальный волоконно-оптический фотоплетизмограф (Kholodkevich et al., 2007, 2008) позволял исследовать указанные характеристики сердечных сокращений одновременно у семи животных.

Функциональное состояние животных оценивали по характеристикам кардиоритма и его вариабельности: частоте сердечных сокращений (ЧСС), среднеквадратичному отклонению в выборке кардиоинтервалов (СКО) и параметру вариационной пульсометрии – стресс индексу (SI), отражающему уровень напряжения регуляторных систем (Баевский, Берсенева, 1997). В качестве биохимического показателя функционального состояния раков определяли концентрацию общего белка в гемолимфе методом Лоури (Lowry et al., 1951). У моллюсков, кроме записи ЧСС, с помощью датчиков Холла (www.mosselmonitor.nl) регистрировали важнейший показатель особенностей их функционирования – движение створок.

Результаты и их обсуждение

В результате анализа данных многодневной регистрации фоновой кардиоактивности изучаемых бентосных беспозвоночных было установлено, что для здоровых животных она характеризуется наличием циркадианного ритма (рис. 1 А, Б).



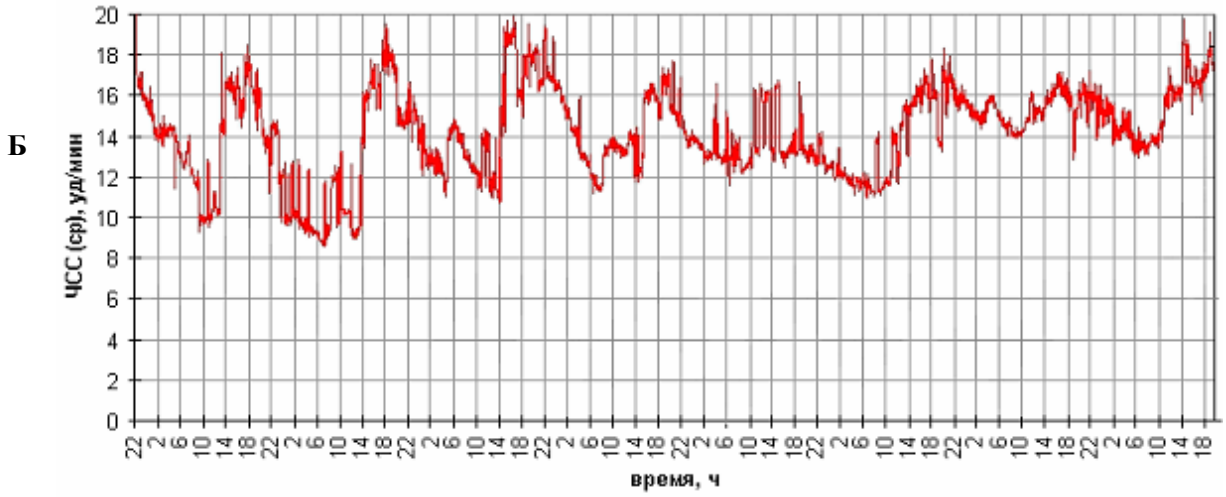


Рис. 1, А. **Типичный пример циркадианного ритма кардиоактивности рака в течение 4-х суток регистрации.** По осям ординат: слева – ЧСС в уд/мин, справа – SI – стресс-индекс в усл.ед. По оси абсцисс: число, месяц, часы и мин реального времени проведения эксперимента

Рис. 1, Б. **Циркадианный ритм кардиоактивности у мидий M. galloprovincialis , зарегистрированный в течение 9-и суток.** Усредненные данные для 7 мидий. По оси ординат – ЧСС в уд/мин. По оси абсцисс – время суток в часах

Ранее при исследовании циркадианной кардиоритмики некоторых видов декапод было высказано предположение о том, что её нарушение является одним из признаков снижения адаптивных способностей организма и может указывать на плохое функциональное состояние животного (Styrishave et al., 1995; Aagaard, 1995; Bojsen et al., 1997, 1998). По результатам наших опытов (Удалова и др., 2009; Кузнецова и др., 2010) с регистрацией фоновой кардиоактивности раков *Pontastacus leptodactylus* Esch в течение многих суток при режиме освещённости близком к естественной, у здоровых животных циркадианный кардиоритм проявляется в повышении ЧСС (до 100–130%) и SI в ночной период (с 20 ч до 8 ч утра) по сравнению с дневным периодом (рис. 1А). Это соответствует ночной активности этого вида раков в природных условиях их обитания. При резких изменениях естественного светового режима или же токсических воздействиях циркадианный кардиоритм существенно нарушался. Серьёзные изменения суточной периодичности ЧСС наблюдались также непосредственно перед линькой, которая является естественным физиологическим стрессом (Удалова и др., 2009).

Наши исследования (Холодкевич и др. 2009) показали, что при нормальном функциональном состоянии моллюски *Mytilus galloprovincialis* Lam. демонстрируют наличие хорошо выраженного суточного ритма движения створок с повышением величин их раскрытия в ночное время. Отметим, что наблюдавшийся циркадианный кардиоритм у моллюсков в значительной степени определялся существенными суточными колебаниями температуры воды в летнее время.

Таким образом, хорошо выраженное и устойчивое проявление циркадианного ритма кардиоактивности (у раков) или движения створок (у моллюсков) рассматривается нами как один из надёжных показателем хорошего функционального состояния этих животных и может применяться при формировании референтных групп.

Для выявления адаптивных способностей, определяющих уровень здоровья и функциональных резервов организма, недостаточно определения характеристик кардиоактивности в покое и при спонтанном двигательном поведении. С этой целью некоторыми исследователями (Bamber et al., 1997; Баевский и др. 1997; Ярославцева, Сергеева, 2008; Холодкевич и др., 2009; Кузнецова и др., 2010) предлагается использовать функциональную нагрузку в пределах толерантности вида. При действии нагрузок, как правило, повышаются энергетические затраты организма и существенно изменяются реакции со стороны сердечно-сосудистой системы, по сравнению с нормальными условиями. В качестве функциональной нагрузки можно использовать неповреждающие механические, физические или химические, лимитированные по силе и продолжительности, кратковременные тест-стимулы. При этом следует учитывать физиологические и поведенческие особенности исследуемого вида.

Простейшей из механических нагрузок, но практически всегда присутствующей при проведении экспериментов, является действие на животных хэндлинга. Для раков это воздействие удобно использовать в качестве тест-стимула, вызывающего генерализованную реакцию всего организма. Даже при кратковременном (1–2 мин) хэндлинге ЧСС рака при этом повышается, достигая уже через 2 мин максимальных значений, резко увеличивается и стресс-индекс. После снятия нагрузки постепенно, в течение часа, эти показатели возвращаются к исходным значениям (см. Таблицу). Усиление ЧСС в ответ на хэндлинг позволяет выявить предельные величины изменений ЧСС, SI и, в известной степени, судить об уровне напряжения регуляторных систем организма.

Критерии отбора референтных групп раков *Pontastacus leptodactylus*

Показатели функционального состояния	Диапазон значений
Вес	55–90 г
Содержание общего белка в гемолимфе	20–80 мг/мл
ЧСС в покое в дневной период (ЧССп)	24–40 уд/мин
вI в покое	1–300 усл.ед.
ЧСС в период ночной активности в циркадном ритме (ЧССа)	≥ 2ЧССп
Длительность периода ночной активности циркадного ритма	8–10 час
ЧСС при хэндлинге	60–120, уд/мин
припри хэндлинге	7000–15000, отн. ед.
ЧСС в начале теста на подвес (ЧСС нач)	≥2ЧССп
ЧСС в конце теста на подвес	≥2ЧССп – 0,30 ЧССп
ЧСС при повышении солености среды	≥ 1,5 ЧССп
Длительность первого подъема ЧСС при повышении солености (NaCl) среды на 1‰.	20–30 мин

Весьма информативным тест-стимулом для раков оказалось применение специального теста на подвес (подвешивание животного на волокон-

но-оптическом кабеле в течение часа над дном аквариума в воде) (Удалова и др., 2010). Потеря контакта конечностей рака с опорой приводит животное в состояние повышенного возбуждения. Во время теста на подвес у раков быстро и значительно повышается ЧСС. Она может у разных особей оставаться на таком уровне в течение часа или же снижаться ещё при подвесе. В конкретном примере (рис. 3) ЧСС при подвесе составляла 102,08±6,87 уд/мин, а SI равнялся 16146±5993 усл.ед. Разность значений ЧСС до подвеса и в первые минуты действия нагрузки могла превышать 100%. Особо подчеркнём, что животные, у которых во время подвеса сохраняются повышенные значения ЧСС, как правило, проявляли в обычных условиях (без нагрузки) адекватные поведенческие реакции, т.е. находились в нормальном функциональном состоянии. Итак, указанный прием позволяет определять характерные для каждого животного максимальные значения ЧСС и SI, выявлять пределы устойчивости кардиоритма во время «нагрузки», на основании чего можно оценивать функциональные резервы организма.

Для пресноводных и морских гидробионтов весьма удобными функциональными нагрузками является изменение солености и/или температуры воды. На рис. 2 А приведен пример реакции со стороны кардиосистемы у здоровых раков на изменение солёности воды (1 г/л NaCl). В ответ на такое воздействие наблюдали кратковременное увеличение ЧСС и SI , величины которых постепенно приближались к фоновым значениям. На рис. 2, Б показаны результаты экспериментов на моллюсках *Mytilus galloprovincialis* Lam. со снижением естественной для них солености морской воды (с 18 ‰ до 12 ‰). Через несколько минут после воздействия наблюдалось повышение ЧСС (как и у раков). Регистрируемая при этом реакция закрытия створок появлялась даже с меньшим латентным периодом, чем изменение ЧСС.

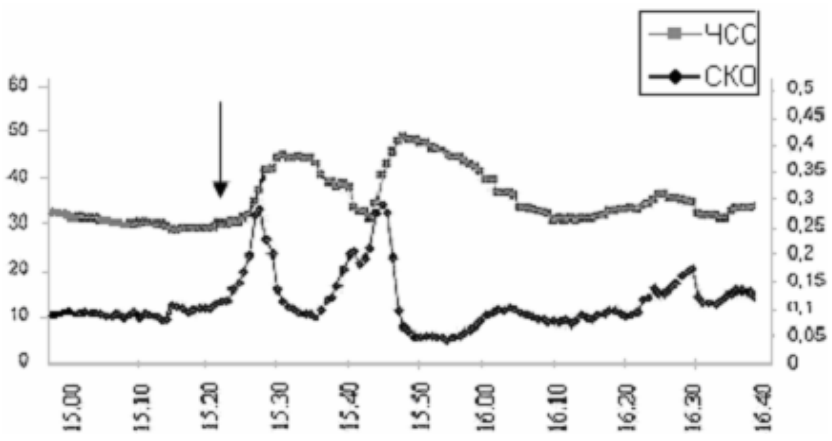


Рис. 2, А. **Влияние повышения солености (на 1‰) на характеристики кардиоактивности рака.** По оси ординат: слева – ЧСС в уд/мин, справа – СКО (среднеквадратичное отклонение) в сек. По оси абсцисс – реальное время проведения экспериментов в ч, мин. Стрелкой указан момент подачи раствора NaCl

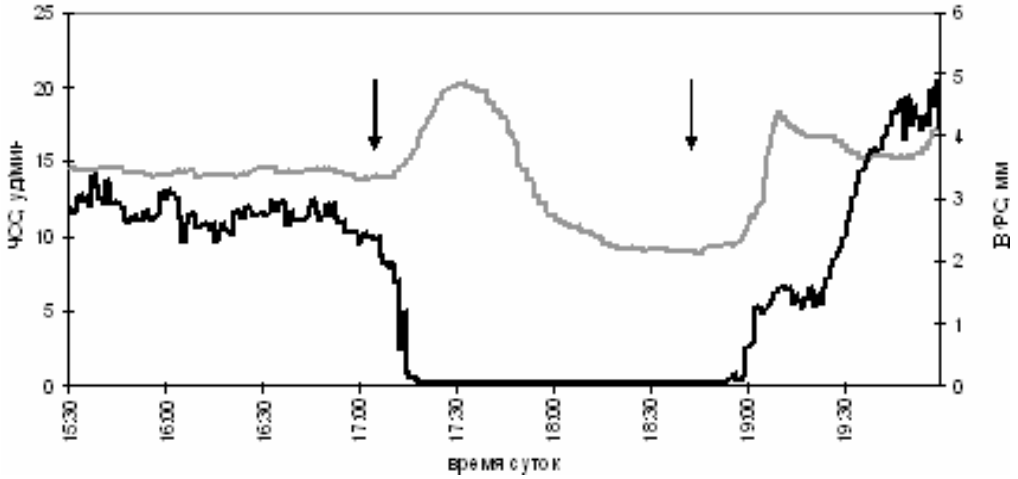


Рис. 2, Б. **ЧСС и величина раскрытия створок (ВРС) при быстром изменении солености воды (с 18 ‰ до 12 ‰ и обратно).** Данные усреднены по 7 мидиям для ЧСС и по 16 мидиям для ВРС. Время подачи пресной воды и обратной замены ее на морскую отмечены стрелками. Серая линия – ЧСС (уд/мин), черная линия – ВРС (мм). По оси абсцисс – реальное время регистрации – час:мин

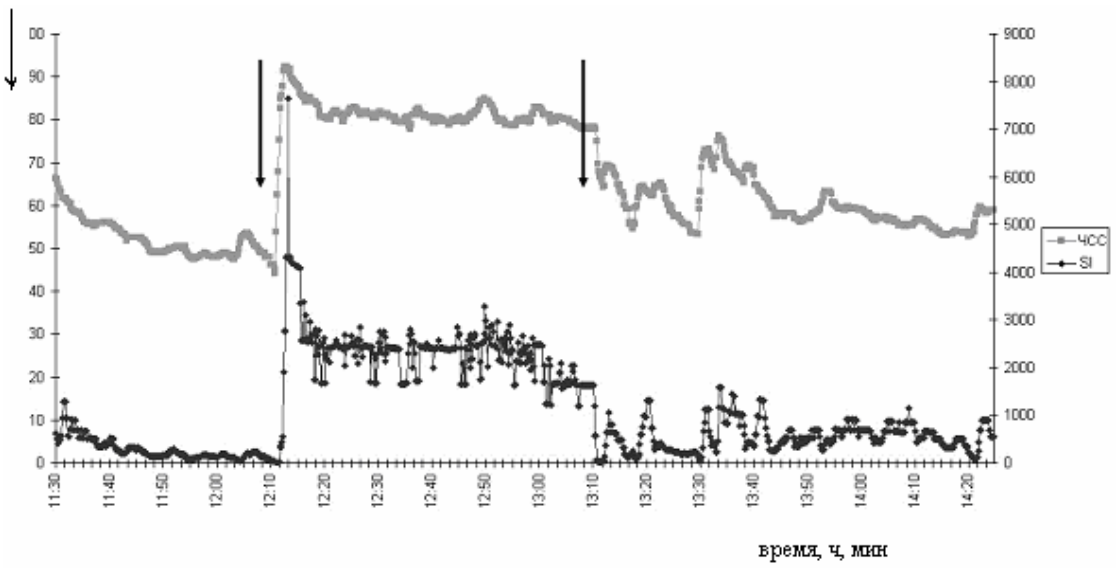


Рис. 3. **Характерное для здоровых раков изменение ЧСС и SI в тесте на подвес.** Стрелками указано начало и окончание теста. По осям ординат обозначения как на рис. 1, А. По оси абсцисс: время – час:мин

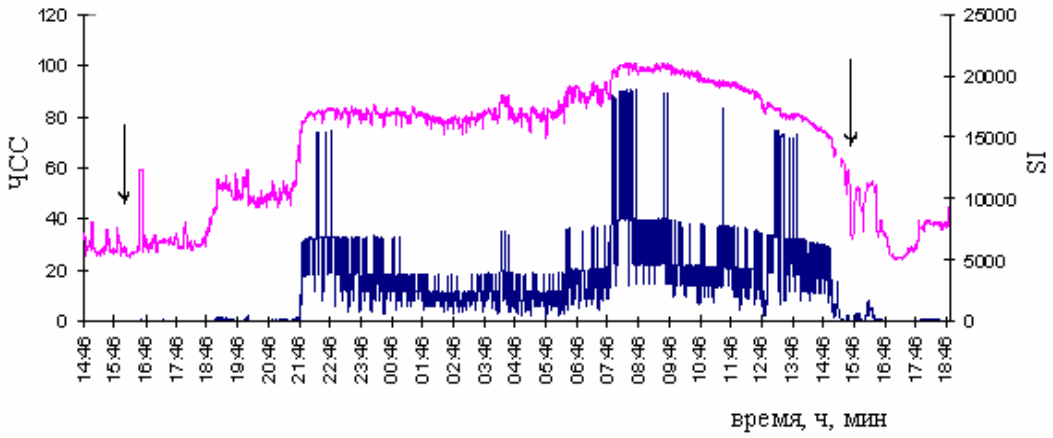


Рис. 4. **Изменения кардиоактивности рака из референтной группы при воздействии гидрохинона в концентрации 1 г/л в течение суток.** По оси ординат: слева – ЧСС в уд/мин, справа – SI в усл.ед. По оси абсцисс – реальное время проведения экспериментов – час:мин. Стрелками указано начало и окончание экспозиции рака в растворе гидрохинона

Для более полной оценки функционального состояния раков к комплексу приёмов, базирующихся на анализе кардиоактивности, нами был применён ещё и биохимический показатель – содержание общего белка в гемолимфе. Он позволяет косвенно оценивать доставку кислорода к органам и тканям животного. Известно, что высокий уровень белка в межлиночный период у декапод соответствует высокому уровню жизнестойкости организма и соответственно их хорошему функциональному состоянию (Depledge et al., 1995; Черкашина, 2002). В проведённом нами исследовании содержание общего белка у находившихся в хорошем функциональном состоянии раков зависело от сезона года и колебалось в широких пределах: 20–40 мг/мл – в осенне-зимний период и 50–80 мг/мл в весенне-летний.

Результаты проведённых нами исследований на раках с использованием применявшихся нами приёмов и методов регистрации морфофизиологических показателей суммированы в таблице.

Мы полагаем, что только применение комплекса предложенных показателей позволит достаточно надежно оценивать индивидуальные особенности функционального состояния раков. На основании указанных критериев нами были сформированы референтные группы раков, которые затем использовались при проведении экспериментов с воздействием некоторых токсикантов (гидрохинона, тяжелых металлов и

др.). В качестве примера приведём опыты с органическим токсикантом – гидрохиноном. При воздействии гидрохинона в течение часа ЧСС и стресс-индекс увеличивались только на 20 мин. Уровень общего белка гемолимфы при этом достоверно не изменялся. При длительном (одни сутки) воздействии гидрохинон вызывал чёткую тахикардию, нарушение циркадианного ритма ЧСС (рис. 4) и уменьшение содержания белка на 40%. Подчеркнём, что выявленные в этой группе индивидуальные реакции раков по разным показателям функционального состояния, характеризовались у исследованных животных данной референтной группы лишь незначительными отличиями.

Выводы

Разработан комплексный подход к отбору тест-организмов, включающий в себя, кроме общепринятых морфометрических характеристик, биохимические и физиологические показатели (биомаркеры), характеризующие работу сердечно-сосудистой системы. Использование его позволяет формировать по выбранным критериям однородные группы раков, сходных по физиологическим показателям а, следовательно, наиболее подходящих как для токсикологических исследований, так и для применения их в качестве биосенсоров в системах биомониторинга качества воды в режиме реального времени.

В ходе дальнейших исследований предложенный перечень критериев может быть изменён или дополнен. Очевидно, что при использовании других видов животных, критерии отбора референтных групп могут несколько отличаться, что будет отражать особенности биологии и физиологии этих организмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 08-04-92424-БОНУС_а и № 10-05-00875-а.

Литература

Баевский Р. М., Берсенева А. П. Оценка адаптационных возможностей организма и риск развития заболеваний. М.: Медицина. 1997. 234 с.

Кузнецова Т. В., Сладкова С. В., Холодкевич С. В. Оценка функционального состояния раков в нормальной и токсической среде по характеристикам их кардиоактивности и биохимическим показателям гемолимфы // Ж.. эвол. биохим. и физиол. 2010. Т. 42. С. 203–210.

Удалова Г. П., Федотов В. П., Иванов А. В., Е. Л. Корниенко, С. В. Холодкевич. Циркадианный кардиоритм и изменения ЧСС в тесте на подвес как критерии для определения нормальногог и стрессового состояния раков *Pontastacus leptodactylus.* // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Материалы III междунар. конференции. Петрозаводск. 2010. С. 180–181

Удалова Г. П., Холодкевич С. В., Сладкова С. В., Иванов А. В., Рымша В. А. Исследования циркадианной активности раков *Pontastacus leptodactylus* при их многомесячном содержании в протоке речной воды. // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2009. Т. 45(3). С. 372–381

Холодкевич С. В. Биоэлектронный мониторинг уровня токсичности природных и сточных вод в реальном времени // Экологическая химия. 2007. Т. 16, № 4. С. 223–232.

Холодкевич С. В., Иванов А. В., Корниенко Е. Л., Куракин А. С. Способ биологического мониторинга окружающей среды (варианты) и система для его осуществления. Бюл. изобр., 2007, № 29. Патент РФ № 2308720 С1, МПК *G01N 33/18* (2006.01); *G01N 21/17* (2006.01). Приоритет от 20.06.2006 г. 49 с.

Холодкевич С. В., Кузнецова Т. В., Трусевич В. В., Куракин А. С. Особенности кардиоактивности и движения створок *Mytilus galloprovincialis* Lam. в норме и при токсическом воздействии // Сборник научных трудов, посвященный 95-летию Карадагской биологической станции и 30-летию Карадагского природного заповедника Национальной академии наук Украины. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009. С. 524 –537.

Черкашина Н. Я. Динамика популяций раков родов *Pontastacus* и *Caspiastacus* (Crustacea, Decapoda, Astacidae) и пути их увеличения // М., 2002.

Ярославцева Л. М., Сергеева Э. П. Адаптивные способности личинок морских беспозвоночных при изменении естественных факторов среды как чувствительный тест на загрязнение морской воды // Биол. моря, 2008, Т. 34, № 1. С. 42–46.

Aagaard A., Warman C.G., Depledge M.H., Naylor E. Dissosiation of heart rate and locomotor activity during the expression of rhythmic behaviour in the shore crab *Carcinus maenas* // Mar. Behav. Physiol. 1995. V. 26. P. 1–10.

Bamber S.D., Depledge M.H. Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments // Mar. Biol. 1997. V. 129. № 4. P. 667–672.

Bojsen B. H., Witthofft H., Styrishave B., Andersen O. Diurnal variation in physiology and behaviour of the noble crayfish, *Astacus astacus* (L.) and the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) // Special rapport. Roskilde Univ. Denmark. 1997, P. 48–61.

Bojsen B. P., Witthofft H., Styrishave B. In situ studies on heart rate and locomotor activity in the noble freshwater crayfish, (*Astacus astacus* L.) in relation to

natural fluctuations in temperature and light intensity // Freshwater Biology. 1998. V. 39. P. 455–465.

Depledge M.H., Aagaard A., Gyorkis P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers // Mar. Pollut. Bull. 1995. V. 31, N 1–3. P. 9–27.

Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randale R. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 93. P. 265–275.

Kholodkevich S.V., Fedotov V.P., Kuznetsova T.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L. Fiber-optic remote biosensor systems for permanent biological monitoring of the surface waters quality and bottom sediments in the real time // http:/www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2007/I/I-2007.pdf

Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L., Fedotov V.P. Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations // Environmental Bioindicators. 2008. V. 3. № 1. P. 23–34.

Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Sladkova S.V. Criteria for selection of crayfish's reference groups in ecotoxicological investigations // Future of Native Crayfish in Europe: Abstr.book. Písek, Czech Republic, 2009. P. 46.

Styrishave B., Rasmusson A.D., Depledge M.H. The influence of bulk and trace metals on the circadian rhythmicity of heart rates in freshwater crayfish *Astacus astacus* // Mar. Poll. Bull. 1995. V. 31. P. 87–92.

www.mosselmonitor.nl

METHODOLOGICAL APPROACHES FOR SELECTION OF REFERENCE GROUPS OF BENTHIC INVERTEBRATES BASED ON COMPLEX OF ASSESSMENTS OF THEIR FUNCTIONAL STATE

S.V. Kholodkevich, T.V. Kuznetsova, S.V. Sladkova, G.P. Udalova., V.A. Lyubimtsev

Scientific Research Center for Ecological Safety RAS, Sankt-Petersburg, Russia
kholodkevich@mail.ru

In the present study common criteria based on organism's functional state (FS) assessment were worked out to form reference groups of benthic animals (crayfish and bivalves) for further biomonitoring and toxicological investigations. Cardiac activity characteristics: stable expression of circadian rhythm in heart rate and stress-index, and particular content of hemolymph total protein were suggested to be the significant parameters for functional state evaluation. Animals from selected reference groups demonstrated similar responses being exposed to toxicant. It was shown that criteria and methods for selection of reference groups could increase the reliability of toxicological studies results.