*Региональный научно-методический ресурсный центр экологического образования*

*Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды «Открытия 2030»*

*Номинация «Экспериментальная зоология»*

**Гормонозависимые реакции у ракообразных (на примере ветвистоусых раков *Daphnia magna*)**

Выполнил:

Сиротин Семен,

11 класс

Научный руководитель:

Степанчук Николай Александрович

Волгоград

-2022-

ВВЕДЕНИЕ

В целях оптимизации антропогенного влияния на окружающую среду разработана система долгосрочных наблюдений – мониторинг (от лат. monitor – тот, кто напоминает, предупреждает). Этот термин впервые появился в рекомендациях научного комитета по проблемам окружающей среды при ЮНЕСКО в 1971 году [5].

В России и за рубежом широко распространены методы быстрого мониторинга с использованием дафний. Дафнии используются в качестве тест-объекта не только для токсикологических тестов, но и для долгосрочных оценок воздействия на биоту биологически активных веществ [1, 18].

Одна из самых острых проблем экологического мониторинга — поиск критериев оценки воздействия факторов среды на гидробионтов. Воздействие веществ чуждой для живых организмов природы в рамках классической токсикологии изучено достаточно подробно, а вещества, имманентно присущие живым организмам, исследованы недостаточно (Кудикина, 2008).

В нашей стране, своеобразным научным центром изучения гормонов на морфо-функциональные особенности онтогенеза беспозвоночных и возможности использования этих показателей в биотестировании, является Балтийский федеральный университет им. И. Канта. Исследователи указывают на недостаточность сведений как о самих гормонах и гормоногенезе у беспозвоночных, так и влиянии гормонов и гормоноподобных веществ экзогенной природы на беспозвоночных и использовании этих данных в биомониторинге.

Показано, что широкий набор различных по структуре химических соединений, попадающих в окружающую среду, может воздействовать на рецепторы гормонов и вызывать соответствующие эффекты. Они способны обусловливать дисбаланс гормонального гомеостаза, что ведет, например, к изменению плодовитости, феминизации и т. д. Такие последствия возникают при попадании в водоемы некоторых пестицидов, обладающих эстрагеновым и другими гормональными эффектами. Сходство механизмов регуляции роста, размножения, обнаруженное у позвоночных и беспозвоночных, позволяет рекомендовать их в качестве тест-объектов для быстрого обнаружения эффектов подобных веществ. Характер изменения гормонального метаболизма дает возможность предсказать последствия воздействия загрязняющих веществ на основные показатели жизнедеятельности [17].

Этим и продиктован наш интерес к данному направлению.

Цель работы: определить характер реакций дафний (*Daphnia magna*) на стероидные гормоны.

Задачи:

- определить характер ростовых процессов у дафний под влиянием преднизолона;

- изучить особенности кардиореакций у дафний на преднизолон;

- дать характеристику репродуктивным функциям дафний в опыте с воздействием преднизолона.

**Глава 1. Обзор литературы**

**1.1. Характеристика объекта исследования**

Дафнии – род мелких ракообразных, широко распространённых в пресных водоемах России [16].

*Daphnia magna* – наиболее крупный представитель рода. Большая дафния достигает 6 мм в дину. Это делает объект очень удобным для наблюдения и проведения измерений.

Тело дафнии заключено в двустворчатый прозрачный карапакс. Это является преимуществом объекта исследования, т.к. можно хорошо рассмотреть внутренние органы, не прибегая к дополнительным методам микротехники.

Дафнии имеют обычный органокомплекс, характерный для ракообразных. Важным диагностическим преимуществом является наличие простого сердца на задней стороне тела, которое не прикрыто иными органами. Это дает возможность визуализировать сердце без дополнительных методов препарирования.

Важной особенностью дафний, которая может быть использована при биотестировании – наличие партеногенетических поколений. При благоприятных условиях развивается несколько партеногенетических поколений. Неоплодотворенные яйца откладываются в выводковую камеру, а из них выходят молодые рачки, приступающие к самостоятельной жизни. При наступлении неблагоприятных условий, самки откладывают первую порцию неоплодотворенных яиц, из которых развиваются только самцы. Те же самки через некоторое время откладывают вторую порцию яиц, которые при созревании прошли мейоз и получили гаплоидный набор хромосом. Такая особенность размножения дафний делает выборку рачков более или менее универсальной в части направления физиологических реакций на тот или иной фактор, т.к. они имеют единый генотип.

**1.2. Общая характеристика эндокринной функции у беспозвоночных животных**

В ходе исторического развития животных, особенно при переходе отодноклеточности к многоклеточности, сформировался вполне обособленный аппарат гуморального управления – эндокринная система. Высшего развития она достигает у позвоночных.

Гормональная регуляция, в отличие от нервной, направлена, преж­де всего, на медленно протекающие реакции в организме, поэтому ей принадлежит главенствующая роль в регуляции формообразователь­ных процессов таких как рост, обмен веществ, размножение, дифференцировка, линька, репродукция и т.д. [2].

В эволюционном ряду беспозвоночных животных самостоятельно оформленные эндокринные железы впервые появляются у кольчатых червей. Наиболее хорошо изучены эндокринные железы у ракообразных и насекомых [9, 10, 11].

Наряду с другими группами высших беспозвоночных, у ракообразных обнаружены две группы гормонов, которые участвуют в реализации основных жизненных функций. В первую группу входят нейросекреторные гормоны пептидной природы. Вторую группу составляют стеридные гормоны, секретируемые вне клеток нервной системы [4].

Были выявлены количественные различия стероидных гормонов в зависимости от жизненной стадии беспозвоночных, наличия у них полового диморфизма, возраста. Совокупность этих данных позволяет предполагать физиологическую значимость разных групп стероидов в организме беспозвоночных животных. Таких сведений в литературе немного. В основном они ограничены данными о влиянии экзогенных половых стероидов и гидрокортизона позвоночных животных на гомеостаз и активность гаметогенеза [6].

**Глава II. Материал и методы исследования**

В качестве материала исследования послужили рачки эксперименте использовали рачков *D. magna* Str*.* (Cladocera, Crustacea) в возрасте 2—3 дней с линейными размерами 0,7—1,3 мм из лабораторной культуры. Каждый эксперимент длился 28 суток [7].

В качестве гормонального препарата нами использован гормон стероидной природы – преднизолон. Выбор гормона стероидной природы обусловлен более длительными воздействиями по сравнению с гормонами пептидной природы.

Экспериментальную среду получали внесением аптечной формы преднизолона в отстоянную воду с дафниями.

Стандартной средой для содержания контрольных животных служила дехлорированная вода. Животные содержались в сосудах емкостью 500 мл при температуре 19-20°С. Плотность посадки составляла 50 особей на указанный объем. Вода частично заменялась на чистую по мере загрязнения.

Кормили дафний обоих групп суспензией сухих дрожжей одной марки до едва заметного помутнения воды с периодичностью 48 ч. Численность особей контрольной и экспериментальной групп составили по 100 рачков в каждой генерации.

Характер воздействия препарата изучался на двух последовательных партеногенетических поколениях дафний: родительское поколение (P), первое (F1) дочернее поколение. 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).

Цифровые данные обрабатывались стандартными статистическими методами с использованием критерия Стьюдента при уровне доcтоверности 95 % [13].

**Глава III. Результаты и их обсуждения.**

**3.1. Характер влияния преднизолона на линейный рост дафний**

Характер соматических реакций дафний в контрольной и опытной группах отличался. Как в опыте с родительским поколением, так и в опыте с первым поколением рачков, линейные размеры были несколько больше, чем, в контрольных группах (табл. 1).

*Таблица 1. Изменение линейных размеров рачков (средние показатели, мм)*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группа | Дни исследования | | | | | | | | | |
| 1 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 |
| Рк | 1,0 | 1,3 | 1,6 | 1,9 | 2,2 | 2,4\* | 2,8\* | 3,0\* | 3,3\* | 3,9\* |
| Ро | 1,0 | 1,4 | 1,7 | 2,1 | 2,5 | 2,9 | 3,4 | 3,9 | 4,1 | 4,6 |
| F1к | 1,1 | 1,3 | 1,7 | 2,0 | 2,2 | 2,5 | 2,8 | 3,1\* | 3,3\* | 3,8\* |
| F1о | 1,1 | 1,3 | 1,8 | 2,0 | 2,3 | 2,7 | 3,0 | 3,4 | 3,7 | 4,2 |

Рк – родители контрольная группа, Ро – родители опытная группа, F1к – первая генерация контрольная группа, F1о – первая генерация опытная группа, \* - достоверные различия.

В среде с преднизолоном в группе родительских особей был обнаружен стимулирующий эффект гормона на рост рачков. Особенно выраженно эффект наблюдали с 9 дня и, практически, до конца эксперимента. В контрольной группе рост дафний был более равномерный.

Практически аналогичные результаты в сравнении с контрольной группой мы наблюдали в первой генерации рачков. Однако в опытных группах, стимулирующий эффект преднизолона был менее заметен в первом поколении по сравнению с родительским.

Возможно, акселераторные эффекты преднизолона связаны с усилением общего метаболизма, ускоренным характером линек [3].

Снижение подобного действия преднизолона во втором поколении дафний можно лишь отчасти объяснить формированием биохимических адаптаций к изменившемуся химизму воды. Несмотря на то, что это, возможно, наиболее вероятностное объяснение, этот факт следует проверить в многократных повторностях и разными концентрациями гормона в среде, определив диапазон возможных колебаний фактора.

**3.2. Особенности кардиореакций у дафний в опыте с преднизолоном**

Как показало исследование, наличие в среде экзогенного преднизолона существенно повлияло на характер работы сердца.

Сразу после помещения дафний родительского поколения в среду с гормоном, наблюдались признаки брадикардии, которая носила выраженный характер до 18 дня. В последующие дни наблюдения кардиотоксическое действие преднизолона проявлялось в меньшей мере и достоверных различий между опытной и контрольной группой обнаружено не было (табл. 2).

*Таблица 2.Частота сердечных сокращений у дафний под гормональным прессом (уд/мин)*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группа | Дни исследования | | | | | | | | | |
| 1 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 |
| Рк | 316\* | 326\* | 333\* | 338\* | 330\* | 300\* | 277\* | 275 | 270 | 276 |
| Ро | 282 | 291 | 302 | 310 | 300 | 289 | 260 | 262 | 261 | 261 |
| F1к | 319\* | 327\* | 330\* | 339\* | 332\* | 306\* | 277\* | 270 | 271 | 271 |
| F1о | 281 | 296 | 300 | 312 | 300 | 296 | 262 | 260 | 262 | 261 |

Рк – родители контрольная группа, Ро – родители опытная группа, F1к – первая генерация контрольная группа, F1о – первая генерация опытная группа, \* - достоверные различия.

Первая генерация рачков имела такой же характер кардиореакций, как и родительское поколение в опыте и контроле. На этом основании мы можем предположить, что кардиологические реакции рачков на экзогенный гормон в большей мере носят стенобионтный характер, чем его действие на ростовые процессы.

У позвоночных животных, характер сердечных реакций на преднизолон несколько иной. Гормон, накапливаясь в сердечной мышце, увеличивал его сократимость, при этом повышалось артериальное давление и в целом, действие гормона на сердце носит кардиостимулирующий характер [14].

У ракообразных, очевидно, частота и амплитуда сердечных сокращений находятся под действием иного, более активного гормона или иного активного вещества, антогонистическое действие которого сильнее, чем стимулирующий эффект преднизолона [12].

**3.3. Характер репродуктивных функций у рачков в среде с эндогенным гормоном**

Как в опытной, так и в контрольной группах родительских особей дафний, яйцепродукция была отмечена лишь на 8 день от начала эксперимента. Однако плодовитость самок в опыте была достоверно выше по сравнению с контролем до конца эксперимента (табл. 3). Различия были довольно существенны и разнились до трех раз в сравниваемых группах.

*Таблица 3. Изменение плодовитости под влиянием гормона (яиц/самку)*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группа | Дни исследования | | | | | | | | | |
| 1 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 |
| Рк | - | - | - | 3,3\* | 3,6\* | 4,8\* | 5,7\* | 5,2\* | 4,1\* | 2,0 |
| Ро | - | - | 1,2 | 4,4 | 5,9 | 6,4 | 7,9 | 8,2 | 6,5 | 3,9 |
| F1к | - | - | - | 3,4 | 3,6 | 4,6\* | 5,6\* | 5,6\* | 3,2\* | 2,8 |
| F1о | - | - | 2,2 | 4,0 | 6,0 | 7,8 | 9,7 | 7,0 | 5,5 | 3,3 |

Рк – родители контрольная группа, Ро – родители опытная группа, F1к – первая генерация контрольная группа, F1о – первая генерация опытная группа, \* - достоверные различия.

Аналогичная закономерность отмечалась и у самок первого поколения. В опытной группе особи первой генерации были более плодовиты, по сравнению с контрольной группой.

Существенных различий плодовитости между родительским поколением и первым поколением самок, как в контроле, так и в опыте нами отмечено не было.

Анализируя результаты опыта, мы имеем основание предположить, что увеличение плодовитости под действием экзогенного гормона, связано с общестимулирующим его действием на обменные процессы.

ВЫВОДЫ

Анализируя результаты работы, мы можем прийти к следующим выводам.

1. Линейные размеры дафний прямо пропорциональны наличию преднизолона в среде. Коэффициент вариации признака следует проверят в опытах многократной повторности в разных диапазонах концентрации гормона.

2. Преднизолон оказывает кардиотоксическое воздействие на дафний. Судя по характеру реакций – это стенофакторная реакция. Поэтому частота сердечных сокращений может быть в большей мере использована как мониторинговый признак.

3. Неодинаков характер репродуктивного потенциала у контрольных и опытных животных. В среде с наличием экзогенного гормона, дафнии более плодовиты, превышая репродуктивный потенциал контрольных особой в три раза.

**Литература**

1. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР.М.: АКВАРОС, 2007. 48 с.

**2. К некоторым вопросам эволюции. Филогенез систем органов у животных.**  / Ходжаян А.Б., Федоренко Н.Н., Краснова Л.А. - Изд: СтГМА. 2009г. 31 с.

3. Кудикина Н.П. Особенности ответных реакций организма ракообразных на экзогенные эндокринные соединения // Тезисы докладов VIII съезда гидробиологического общества РАН. Калининград, 2001. Т. 1. C. 18—22.

4. Кудикина, Н. П. Экологические аспекты динамики стероидных гормонов в репродуктивном цикле морских двустворчатых, брюхоногих и головоногих моллюсков //Уч.зап.Казанского ун-та.2007.Т.9, № 3. С.214—224.

5. Кудикина, Н.П. Интегративные системы гидробионтов и их роль в экологическом мониторинге. // Вестник Российского государственного университета им. И. Канта, № 7, 2008. С. 60-66.

6. Кудикина, Н.П. Стероидные гормоны в жизненном цикле двустворчатых моллюсков. // Вестник Балтийского университета им. И. Канта, № 7, 2013. С. 78-85.

7. Кудикина, Н. П., 2015 Daphnia magna Straus (1826) (Cladocera, Crustacea) как тест-объект для оценки эндокринных нарушений у гидробионтов. // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. 2015. Вып. 1. С. 122—130.

8. Лихачев, С.В. Биотестирование в экологическом мониторинге: учебно-методическое пособие / С.В. Лихачев, Е.В. Пименова, С.Н. Жакова. – Пермь: ИПЦ «Прокростъ», 2020. 89 с.

9. Никитина, С.М. Стероидные гормоны беспозвоночных животных / С. М. Никитина. - Л. : Изд-во ЛГУ, 1982. - 172 с.

10. Рупперт, Э.Э., Фокс С.Р. Барнс Д.Р.. Зоология беспозвоночных. Том 1. – М.: Академия, 2008 г. - 484 с.

11. Рупперт, Э.Э., Фокс С.Р. Барнс Д.Р., Зоология беспозвоночных. Том 3. - М.: Академия, 2008 г. - 487 с.

12. Проссер, Л. Сравнительная физиология животных. Т. 3. - М., 1977. - 640 с.

13. Степанчук, Н.А., Прилипко, Н.И. Практикум по общей экологии. – Волгоград, Учитель, 2009. – 209 с.

14. Теппермен, Дж., Теппермен, Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Воодный курс. – М.: Мир, 1989. – 656 с.

15. Шарова И.Х. Зоология беспозвоночных. – М.: ВЛАДОС, 2002. 592 с.

16. Dodson S.I., Shurin I.B., Girvin K.M. Daphnia reproductive bioassay for testing toxicity of agueous samples and presence of an endocrine disrupter // Wisconsin Alum. Research Foundation. 2000. № 8. Р. 76 ─ 84

17. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012 - U.S. Environmental Protection Agency, 2002 266 p.