

РОЛЬ СВЕРХМАЛЫХ ДОЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ У ГИДРОБИОНТОВ

Лебедева Н.Е. кандидат биологических наук
Тушмалова Н.А. доктор биологических наук

Светлой памяти моего УЧИТЕЛЯ В.В.Ковальского.

Об общих закономерностях эффектов веществ в СМД и о феромоне тревоги

Начало изучения микроэлементов профессором Виктором Владиславовичем Ковальским с 30х годов прошлого века показало, что ряд ядовитых для биоты солей в больших дозах (соли меди, кобальта ,цинка урана и др) в микроколичествах необходимы для жизнедеятельности организмов. Аналогичное изменение эффекта может нас ожидать и при переходе в мир сверхмалых величин – вещества или его размера

Возрастающее внимание к феноменам СМД обусловлено поиском способов минимизации воздействий на окружающую среду. Последнее важно учитывать при совершенствовании природоохранной тактики. Суть последней заключается в уменьшении вредных воздействий на живые организмы. При этом загрязнения могут быть даже в незначительных (сверхмалых) количествах. Под сверхмалыми дозами веществ (в дальнейшем мы будем называть их нанодозами - НД) понимают концентрацию до 10^{-17} моля (М) [1]. Несмотря на почти фантомную величину этих доз, получены достоверные эффекты некоторых воздействий в НД на различные биологические объекты [1а]. Изученные свойства НД позволяют обнаружить общие закономерности их действия [1б].

Основные закономерности действия НД проявляются в характере дозовой зависимости (би- или полимодальный) с наличием мертвой зоны. Кривая доза – эффект выглядит следующим образом: вначале наличие эффекта, затем его отсутствие (в области 10^{-12} - 10^{-8} М). Далее

при уменьшении концентрации вещества вновь обнаружен эффект, однако, как правило противоположного знака. Возможно, в характере этой зависимости выявляется и принцип надежности биологической организации – (биологического ответа на вещества, присутствующие в окружающей среде). Хотелось бы высказать предположение и о том, что бимодальная кривая эффект - доза может служить отражением ритмичности гомеостаза.

Обнаружена ещё одна закономерность эффектов НД: живые организмы отвечают диаметрально противоположным образом на большие и малые дозы воздействий. Для этого явления был предложен термин гормезис.

Парадоксальным эффектом НД является и то, что биологическая система может "почувствовать" влияние фактора, введённого в неё извне в концентрации на несколько порядков ниже тех, которые имеются в самой системе (органе, организме и т.п.) [2]. Найдено, что в тканях и органах организмов содержится в среднем от 10^{-8} до 10^{-11} М гормонов, нейромедиаторов, нейропептидов и других биологически активных веществ. Вместе с тем показана способность клеток и тканей реагировать на воздействия в концентрации меньше 10^{-17} М [3]. Одним из биогенных веществ, проявляющих свой эффект в малых дозах являются биологически активные соединения - феромоны, как их образно называют – гормоны среды. Эти соединения, выделяются растениями и животными в окружающую среду и влияют на поведение или физиологическое состояние других особей только своего вида. Это свойство феромонов называется видоспецифичностью. Особенно полно изучена и широко известна роль феромонов в жизни насекомых. В последнее время интенсивно исследуются и получают практическое применение феромоны сельскохозяйственных животных и даже человека. Значительно меньше изучены феромоны у водных животных. Несмотря на различия воздушной и водной среды, у феромонов водных и наземных организмов много общего. Например, показана видоспецифичность их действия. Так феромон тревоги карпа эффективен только у карповых рыб и у близких в систематическом отношении «родственников». Найдена поведенческая активность в малых дозах (в частности, этот феромон, действует до концентрации 10^{-8}) и некоторые другие свойства. Важно отметить, что феромон тревоги вызывает у карповых

состояние стресса и сопутствующие этому синдрому биохимические сдвиги. Опираясь на упомянутую выше концепцию гормезиса логично предположить, что более низкие концентрации феромона тревоги – его НД - могут корректировать развитие синдрома тревоги (стресса) [4].

Эффект НД феромона тревоги у одноклеточных организмов в водоёме

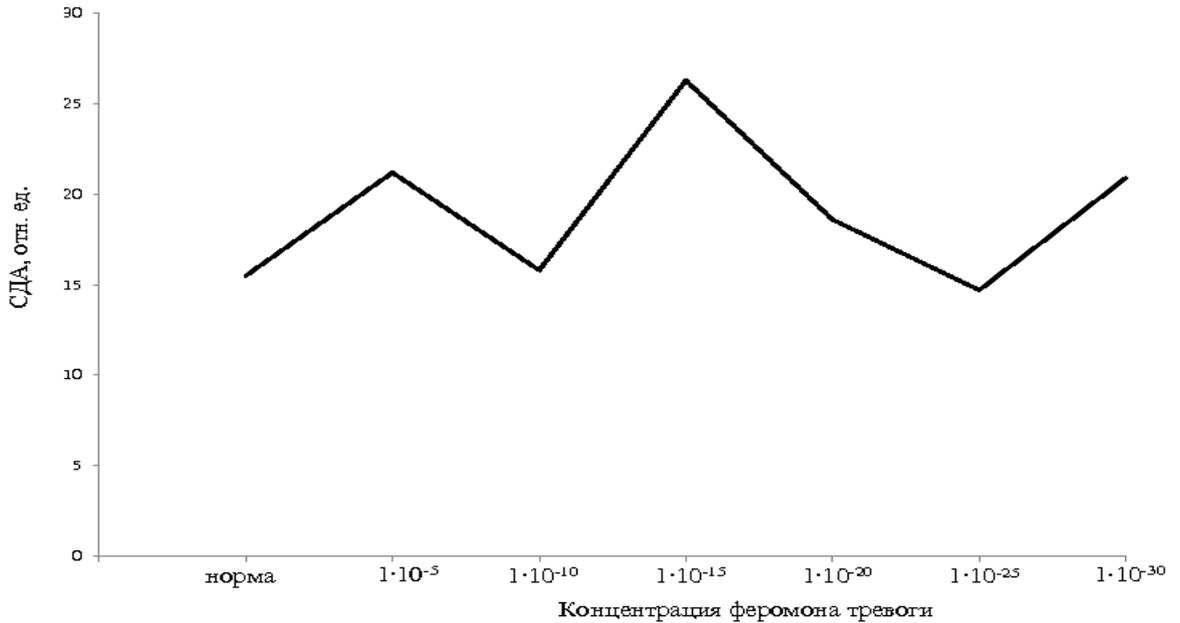
В настоящей работе представлены полученные авторами экспериментальные результаты по выявлению эффекта нанодоз феромона тревоги карповых рыб на физиологический статус водных организмов, а также сделана попытка обсуждения роли НД биологически активного вещества в водоёме. Эксперименты по влиянию НД проводили на двух группах водных организмов: простейших одноклеточных - инфузориях спиростомах (*Spirostomum ambiquum Ehrbg.*), а также низших позвоночных – рыбах. Используемый в экспериментах в НД (1×10^{-15}) феромон тревоги, изготовлен по авторской технологии запатентован и получил название циприн [5].

Среди «ответных» реакций животных на внешние воздействия, поведение относится к наиболее чувствительным феноменам. Важнейшим показателем функционального состояния одноклеточных является двигательная активность. По изменению поведения у этих животных судили о характере воздействии и его величине. Количественным показателем поведения выбрана спонтанная двигательная активность (СДА) , выраженная в относительных единицах [6

]. Ранее, в опытах на спиростомах нами было показано, что фенозан (синтетический препарат, блокирующий работу одной из ферментных систем) в концентрациях до 10^{-25} М в полтора раза, повышает двигательную активность одноклеточных [1в]. В проведенном нами ранее исследовании [7] установлено, что спиростома воспринимает феромон тревоги рыб. Однако концентрация его (1×10^{-5}) в тех экспериментах на десять порядков больше, используемой в настоящей работе. Для выявления эффективности более низких концентраций использовали серию

разведений, приготовленных с применением гомеопатической технологии. На рисунке 1

Рис. 1 Влияние спектра разведений феромона тревоги рыб на спонтанную двигательную активность (СДА) инфузории спиростомы.



представлены средние данные из 10 опытов. Наглядно показан стабильный дифференцированный поведенческий ответ спиростомом на спектр ($1 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-10}$; $1 \cdot 10^{-15}$ - циприн; $1 \cdot 10^{-20}$; $1 \cdot 10^{-25}$; $1 \cdot 10^{-30}$) исследованных концентраций (Рис.1). На рисунке ясно виден нелинейный ритмический характер зависимости. Показано, что величина эффекта от НД феромона колеблется от максимального (в точках №№1, 3 и 5) до минимального (в точках №№2, 4 и 6). Представленными здесь экспериментами подтверждается принципиальное сходство характера воздействия биологически активного вещества в НД, с показанными ранее эффектами других соединений в НД [16]. Результаты представленных в настоящем сообщении исследований доказывают, что изучаемые нами водные одноклеточные дифференцированно воспринимают концентрацию НД. Исследования влияния НД на базисные универсальные формы поведения у организмов, даже стоящих на низкой ступени эволюционного развития, представляет несомненный интерес, поскольку позволяет рассматривать поведение как один из древних факторов регулирующих состояние биоценоза и характеризующих его свойства. Обнаружение эффекта НД у водного одноклеточного имеет

и практическое значение. Разработанные и применяемые авторами высокочувствительные функциональные методы оценки двигательной активности инфузорий, позволяют спиростоме быть хорошим тест – объектом при изучении воздействия НД.

Ранее нами получены убедительные данные у микроорганизмов. Установлена стимуляция роста колоний *Escherichia coli* при обработке их НД феромона. По тесту КОЕ (колоний образующая единица) количество колоний бактерий при добавлении в среду НД увеличилось на 37% . Достоверное возрастание количества колоний указывает на способность НД феромона стимулировать жизнедеятельность клеток. Исследовали и эффект НД феромона на изменение скорости эмбрионального развития икры рыб. Найдено, что НД феромона повышают выживаемость больше, чем в два раза. Достоверно увеличивается и скорость развития икры [8]. Из приведенного экспериментального материала следует, что все испытанные нами одноклеточные водные организмы воспринимают воздействие НД феромона. Вместе с тем выявленную нами активность, можно рассматривать как эффективность НД на уровне организма (одноклеточного) и на уровне клетки. Следует подчеркнуть, что НД феромона изменяют знаковые для жизнедеятельности изучаемых организмов критерии

. Эффективность НД феромона тревоги на некоторые виды рыб (in vivo u in vitro)

Для сравнительной оценки эффекта НД феромона у высоко организованных водных позвоночных эксперименты проводили на нескольких видах рыб. Выбор изучаемых видов (каarp, толстолобик, осетр, тиляпия и форель) обусловлен их принадлежностью к далёким в систематическом отношении семействам. У рыб ранее были показаны нарушения в обмене веществ, вызванные состоянием тревоги (стресса), которые сопровождаются сдвигами биохимических параметров. Первая серия опытов (табл. 1) проводилась для изучения изменений при кратковременном, остром стрессе и попытках его нормализации НД феромона. Острый стресс вызывали - перевозкой и низкой концентрацией кислорода в воде, где находились рыбы. Об изменениях физиологического статуса судили по сдвигам биохимического состава специфической жидкости - наружной слизи рыб [9]. Наиболее информативным и специфическим критерием

стресса у рыб служит появление гемоглобина в их наружной слизи. Представленные в таблице 1

Табл. 1. Биохимические показатели слизи и крови рыб при стрессе и действии НД антистрессора

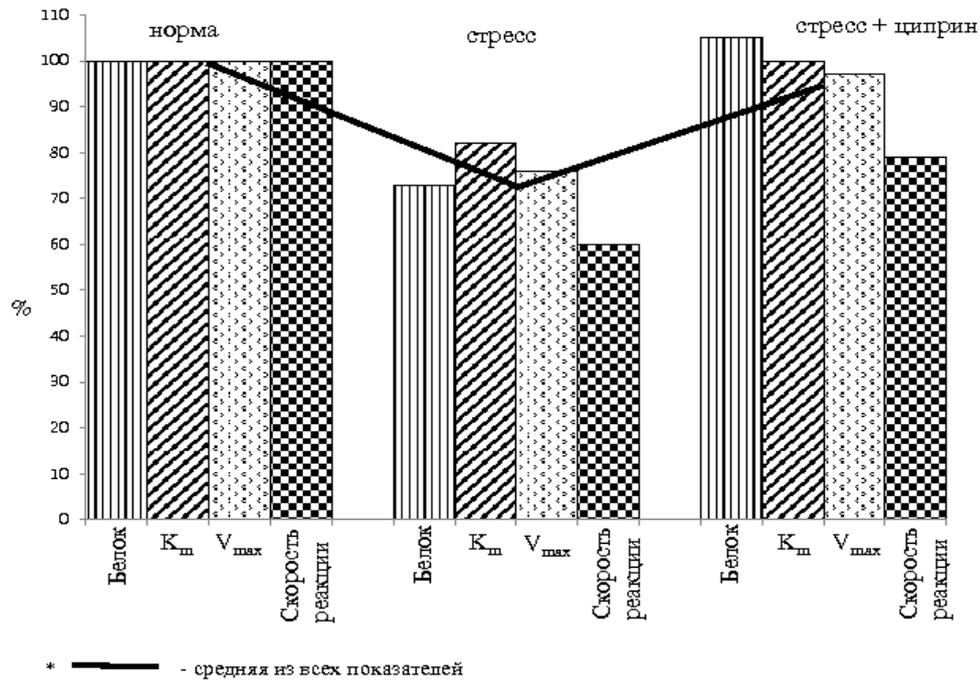
	ОСТРЫЙ СТРЕСС					ХРОНИЧЕСКИЙ СТРЕСС	
	(СЛИЗЬ)			(КРОВЬ)		(СЛИЗЬ)	
	<i>Осетр</i>	<i>Карп</i>	<i>Тялятия</i>	<i>Карп</i>	<i>Форель</i>	<i>Карп</i>	<i>Тялятия</i>
КОНТРОЛЬ							
Гемоглобин	100	100	100			100	-
Белок	100	100	100			100	-
Объём эритроцита	-	-	-	100	100	-	-
СГЭ*	-	-	-	100	100	-	-
СТРЕСС							
Гемоглобин	126	253	129			677	610
Белок	326	300	404			517	392
Объём эритроцита	-	-	-	86	116	-	-
СГЭ*	-	-	-	103	133	-	-
СТРЕСС+ НДферомона							
Гемоглобин	70	112	76			187	356
Белок	260	153	106			156	96
Объём эритроцита	-	-	-	100	103	-	-
СГЭ*	-	-	-	101	103	-	-

*содержание гемоглобина в эритроците

Для удобства сравнения эффекта по четырём различным параметрам, полученные экспериментальные данные представлены в процентах

результаты свидетельствуют о значительных изменениях при остром стрессе у всех видов исследованных рыб. Из таблицы видно увеличение содержание гемоглобина и белка, а также изменение рН и плотности слизи. Отмечены и сдвиги в формуле крови. В ходе эксперимента найдено, что воздействие НД феромона оказывает антистрессовое воздействие на рыб. Добавление препарата в воду к стрессированным рыбам практически нормализовало сдвиги от стресса по исследуемым биохимическим показателям слизи и крови (табл.1). При этих условиях у стрессированных рыб нормализуется и содержание общего белка в ткани мозга, сниженное при стрессе (рис.3).

Рис. 2а. Влияние НД феромона на скорость реакции и кинетические характеристики АХЭ (в экспериментах *in vivo*)

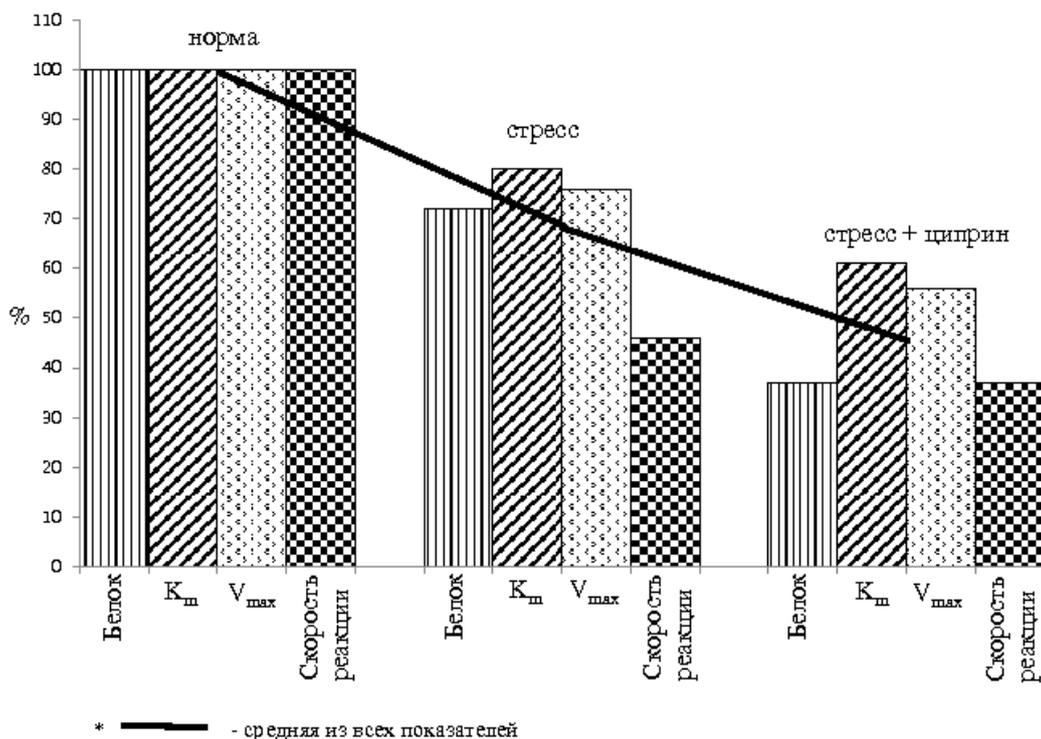


Важно обратить внимание на то, что возвращение к норме изучаемых параметров выявлено у всех видов исследованных рыб, даже относящихся к далёким в систематическом отношении группам. Следует особо отметить, что найденные эффекты отличались только по величине, а не по его направленности.

Во второй серии опытов стрессировали рыб длительным содержанием в водоёме с некомфортным Рн. Хроническое стрессирование вызывает глубокоразвитый стресс, который сопровождается более значительной величиной сдвигов изучаемых параметров. Действительно, удалось показать, что при хроническом стрессе количество гемоглобина в слизи увеличивалось в 6.5 раз. НД феромона лишь частично снижают это повышение, однако полной нормализации не наступает. Вместе с тем репарация происходит практически на 70% (табл.1). Вероятно, величина постстрессовых репараций после обработки НД феромона несколько варьирует, находясь в зависимости как от времени обработки препаратом, так и от глубины развития стресса. В результате проведенной работы можно сделать и «побочный» практический вывод: для достижения максимального эффекта НД необходимо подбирать время воздействия препарата и соотносить его со временем начала стресса.

Представляло несомненный интерес испытать воздействие НД феромона на тканевом и клеточном уровнях у рыб. Ранее было показано, что НД некоторых физических и химических воздействий изменяют активность одного из ключевых ферментов стресса ацетилхолинэстеразы (АХЭ) при исследовании как на уровне целого организма (*in vivo*), так и на фракцию мембран и очищенный фермент (*in vitro*) [10]. С целью выявить корреляцию изменений при обработке НД феромона целого организма с изменениями в его тканях и клетках оценивали активность и некоторые характеристики АХЭ в мозге рыб. В последующих экспериментах удалось показать что при развитии стресса у рыб (опыты *in vivo*) снижается активность и изменяются кинетические характеристики АХЭ (Рис.2в).

Рис. 2в. Влияние НД феромона на скорость реакции и кинетические характеристики АХЭ (в экспериментах *in vitro*)



Добавление НД феромона в воду к стрессированным рыбам нормализует кинетические характеристики АХЭ. При проведении

эксперимента «в пробирке» *in vitro* (добавление НД феромона к гомогенату головного мозга стрессированного карпа) также обнаружены изменения исследованных параметров. Однако следует особо подчеркнуть, что направленность изменений была противоположной (Рис 2 б). Подобный эксперимент с фракцией мембран головного мозга стрессированной тилляпии выявляет аналогичный эффект. (Рис.2 б) Добавление НД феромона к очищенному коммерческому препарату АХЭ из эритроцитов крови человека не оказывает заметного действия на активность фермента вне зависимости от разведения добавляемого препарата и не меняет кинетических характеристик фермента. Исследования проведенные на водных позвоночных, позволили выявить и сопоставить эффект НД феромона у одного животного на разных уровнях биологической организации. При стрессе у рыб обнаружены изменения биохимических параметров в слизи и крови, а также свойств и кинетических характеристик АХЭ мозга – одного ферментов стресса. Выявлен нормализующий антистрессовый эффект НД феромона на эти параметры. При исследовании эффекта НД феромона *in vitro* показано, что добавление его к тканям и органеллам мозга также вызывает значительные сдвиги активности АХЭ. Однако эти изменения противоположного знака и приводят к ещё большему снижению, а не нормализации изучаемых параметров.

Биоиндикация НД на водных организмах

Опираясь, на полученные экспериментальные данные, можно сделать практический вывод. Для обнаружения эффектов НД могут быть использованы в виде биотестов различные исследованные нами живые организмы. Бактерии (рост и размножение по показателю КОЕ); простейшие (поведение – двигательная активность); икра рыб (выживаемость и скорость развития); различные виды рыб (прижизненно - биохимический состав наружной слизи и метаболические критерии в тканях - клетках и их органеллах). Рассмотрев на этих примерах эффект НД, можно сделать и следующий общий вывод. Выявленное их влияние на многие характеристики живого (такие как рост, размножение, физиологический статус); на различные фазы жизненного цикла (эмбрионального развития и взрослого организма) и функции (поведения и движения) позволяет

судить о значении НД у водных организмов. Проведенные исследования на организменном и тканевом уровне подтвердили необходимость учитывать эффект при выборе минимально допустимой концентрации и охране экосистем от антропогенного воздействия. Дальнейшее изучение функционального состояния гидробионтов под влиянием НД различных веществ, позволит более полно охарактеризовать экологическую ситуацию в водоеме. Природные воды могут интегрировано, отражая состав и воздуха и почвы, служить критерием состояния окружающей среды. Моделирование ситуации в гидросфере позволит прогнозировать повреждающее воздействие токсикантов в НД на водных животных. Анализ результатов проведенных экспериментов показал, что принятая тактика исследования качества окружающей среды может быть использована для оценки состояния среды, измененной различными факторами, включая НД

Одно из проявлений универсальности эффекта НД – отсутствие /исчезновение их видоспецифичности?

Суммируя полученные нами и представленные в этой статье результаты, представляется уместным сделать основной вывод: биологически активное вещество феромон тревоги рыб, находящееся в водоёме в НД, оказывается эффективным у водных обитателей. Особо хотелось подчеркнуть, что активность НД проявляется в эксперименте на биологических системах разного уровня организации от макромолекул, клеток, органов и тканей до целых организмов.

В общебиологическом и эволюционном аспектах важно, что этот эффект был обнаружен и исследован как у водных беспозвоночных - инфузорий спиростом, так и у некоторых видов рыб. Выявленные нами факты хорошо согласуются с установленными известными закономерностями действия НД:

1. Би- или полимодальный характер зависимости доза-эффект обнаружен и у спиростомы при тестировании ряда разведений феромона (рис.1).

2. При уменьшении концентрации до НД феромон тревоги проявил эффект противоположного знака у рыб. НД феромона нормализуют стрессовые изменения, обнаруживая тем новые антистрессовые свойства.

3. У НД феромона исчезло такое важное присущее феромону свойство как видоспецифичность. Напомним, что феромон тревоги вызывает стресс в больших дозах только у карпа и его ближайших родственников. Однако его НД проявляют антистрессовую активность у рыб, далёких от карпа в систематическом отношении (лососевые, осетровые и окунёвые). Видоспецифичности эффекта не найдено и на клеточном уровне. Синдром стресса отсутствует у клеток *a priori*. Однако эффект НД прослеживается на различных клетках и заключается в изменении знаковых для их жизнедеятельности критериях. Так, у одноклеточной спиростомы НД изменяет двигательную активность. В ткани мозга рыб у клеток и её органелл НД приводит к сдвигам АХЭ и её характеристик. Выше приведены данные по влиянию НД на *E.coli* и на развивающуюся икру рыб. Получение эффекта от применяемых веществ в концентрациях, сниженных от привычных нам на несколько порядков, позволяет уменьшить и сопутствующее эффекту, возможно, «вредное», с биологической точки зрения, видоспецифическое влияние. Обнаруженная утрата видоспецифичности эффекта у биологически активного вещества представляет с нашей точки зрения особый интерес, поскольку может являться одним из проявлений универсальной роли НД.

зникает во всех струПри действии НД на клетку, ткань или многоклеточный организм эффект вокрутах и затрагивает многие характеристики биоты. Обнаруженные факты расширяют представление об универсальности эффекта НД на животных. В целом, эволюционная стабильность (универсальная для всего живого) функционального значения НД может служить примером энергетически экономного пути развития. Его суть состоит в сформированном в процессе эволюции механизме защиты природы от «лишних» сильных воздействий среды, приводящих к значительным скачкам гомеостаза. . Следует ещё раз подчеркнуть, что эффект нанодоз специфического биогенного вещества феромона тревоги выявлен у эволюционно далёких представителей водной фауны - беспозвоночных и позвоночных животных

Возможная гипотеза механизма действия НД - структурированность воды?

Одной из гипотез, которая может объяснить однотипность влияния НД на растительные и животные организмы, включая человека, может быть общность молекулярных механизмов, определяющих ответные реакции на эти дозы. Говоря о перспективах дальнейшего расширения изучения биологического аспекта НД, отметим, на наш взгляд, важность продолжения и развития – экологических исследований, используя получаемые современные данные.

В частности, водная среда, являющаяся «родным домом» для водных животных, характеризуется не только температурой, солёностью, Рн и прочими несомненно важными параметрами, которые необходимо учитывать при экологических исследованиях. Крайне важен для экологии водоёма и набор биогенных соединений, выделяемых его обитателями. В этом космосе для водных организмов биогенные соединения, особенно с информативными свойствами, могут играть важную, по большей части не установленную ещё роль. Причём значимость этой роли не определяется значительными концентрациями присутствующих соединений. Вместе с тем необходимо принимать во внимание и относительно недавно полученные данные о неизвестных ранее свойствах воды, которые изменяют и дополняют прежние представления о воде как универсальном растворителе, в котором находятся различные химические и биогенные вещества. В ряде лабораторий активно исследуется в последнее время структурированность воды (водные молекулы образуют двух- и другие многофазные системы, в которых между фазами создаются скачки электрических потенциалов, обусловленные различием активности электронов). По мнению разных авторов это крайне важно для решения проблемы информационного взаимодействия в водной среде. Следует отметить и довольно часто упоминаемую теперь «память» воды. Это сохраняющееся или точнее медленно релаксирующее и поэтому считающееся устойчивым образование из структурных элементов воды подвергнутой

воздействию каких-либо внешних факторов. Вероятно, как считают некоторые учёные, расшифровка структуры воды (энергетическое состояние) молекул воды и раскрытие механизма образования стабильных структурных элементов должно содержать в себе объяснение и этому столь необычному и трудно воспринимаемому явлению – сохранению информации, что и связано с малоизученной ролью растворённых в воде различных химических соединений в НД. «Тот, кто научится управлять состоянием водной среды — научится управлять состоянием нашего организма», – писал лауреат Нобелевской премии Альберт Сент Дьёрди. Авторы не являются специалистами в этой области и не претендуют на объяснение явлений, связанных с вышеперечисленными фактами, не вошедшими в круг научных интересов биологов. Вместе с тем авторы полагают важным привлечь внимание, особенно «водных биологов» к вновь открытым свойствам воды в связи с возможным влиянием этих свойств на живые организмы.

Итак, биологический смысл феномена НД состоит в эволюционно сформированной защите природы (природоохранный аспект). Одним из механизмов этой защиты служит минимизация энергетических затрат, обусловленная возможностью адекватно/адаптивно реагировать на разные по природе воздействия в НД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.Б. Бурлакова, А.А. Кондратов, И.В. Худяков *Воздействие химических агентов в сверхмалых дозах на биологические объекты. Известия АН СССР 1990 серия биологическая, N2, стр 184-194.*

1а Е.Б. Бурлакова *Эффект сверхмалых доз Вестник Российской АН 1994 т 64 № 5 с425-431.*

1б Бурлакова Е.Б. *Антиоксиданты Российский химический журнал 2007 т11 №1 С 3-12.*

1в Е.Б. Бурлакова, А.Н. Голощанов, С.В. Зенин, М.Л. Злочевский, Н.Е. Лебедева, Е.М. Молочкина, М.С. Томкевич, Н.А. Тушмалова *О*

некоторых объективных показателях действия потенцированных растворов. Тр. Моск. межд. конф. "Нерешенные проблемы гомеопатии и метода Фоля М. 1997 С.11

2. Кузин А. М. 2002 Роль природного радиоактивного фона и вторичного биогенного излучения в явлениях жизни М Наука

3. Ткачук В.А. 1983 Введение в молекулярную эндокринологию Москва Изд МГУ

4. N.E. Lebedeva, M.S. Tomkevich, N.A. Golovina M.Z. Vosyliene, T.V. Golovkina 1999. On gormesis of alarm pheromone of cyprinids. J. Pheromones, 1999, V.6. p. 65-68

5. Патент на изобретение N 2156571 " Препарат антистрессового действия на рыб и способ его изготовления" по заявке 99115483 Приоритет 23 .07.1999. Зарегистрирован 27 сентября 2000г

6. Тушмалова Н.А., Бурлакова Е.Б., Лебедева Н.Е., Томкевич М.С. Головкина Т.В. Поведение донервных организмов - индикатор эффекта сверхмалых доз. Вестник МГУ. 1998 N4. С. 24-26.

7. Н.А. Тушмалова, Н.Е. Лебедева, Т.В. Головкина Поведение как индикатор межвидового взаимодействия гидробионтов (на примере экзометаболической сигнализации). 1994. ДРАН. Т.337. N1, с.131-133.

8. N.E. Lebedeva. 2001. Effect of ultralow concentration: influence of chemical natural substances on biota. Biogeochemistry and geochemical ecology. Moscow. Russian Academy of sciences. p. 145-151

9. N.E. Lebedeva Skin and superficial mucus at fish - biochemical structure and functional role. 1999. Ichthyology. New Dilhi. Calcutta. ed. D.N. Saksena. PP.177-193

10. Е.М. Молочкина, И.Б. Озерова, Е.Б. Бурлакова 2000 Действие фенозана и ацетилхолина в широком диапазоне концентраций на активность АХЭ и систему липидной пероксидации в мембранах

*головного мозга Российский химический журнал 1999 т. XLIII №5 с
63 -71*