Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ
КАФЕДРА ПРИКЛАДНОЙ ЭКОЛОГИИ

Направление подготовки: 05.03.06 – Экология и природопользование
Профиль: Управление качеством окружающей среды и природными ресурсами

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ВОРТИОКСЕТИНА НА ПЛАВАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДАФНИЙ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ОСВЕЩЁННОСТИ

Студент 4 курса
02-602 группы:
«___»_____ 2020 г. _____ (Калинина А.А.)

Научный руководитель,
к. г. н., доцент
«___»_____ 2020 г. _____ (Никитин О.В.)

Заведующий кафедрой прикладной экологии
д. б. н., доцент
«___»_____ 2020 г. _____ (Степанова Н.Ю.)

Казань – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 5
1.1 Фармацевтические препараты в окружающей среде 5
1.2 Мультимедийные модели прогнозирования 8
1.3 Вортиоксетин 11
1.4 Поведенческий мониторинг 13
1.5 Автоматизированные системы биомониторинга 16
1.6 Реакция *Cladocera* на освещение различного спектра 19
1.7 Мониторинг вод с использованием *Daphnia magna* 27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 34
ВЫВОДЫ 41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 42

ВВЕДЕНИЕ

Огромное количество фармацевтических препаратов ежегодно попадает в окружающую среду во время производства или с продуктами жизнедеятельности после потребления их человеком. Препараты попадают в природные водоемы, где могут оказывать воздействие на гидробионтов. Известно, что они влияют на поведение водных организмов, их активность и репродуктивность. Именно поэтому существует необходимость тестировать препараты на экологическую безопасность.

Цель экологической защиты направлена на популяцию, биоразнообразие и качество экосистемных услуг. В случае угрожаемых и находящихся под угрозой исчезновения видов целью защиты является индивидуальный уровень биологической организации, но это не учитывается в нынешнем подходе к испытаниям химических веществ. Конечными точками при проведении необходимых испытаний на токсичность являются: рост, смертность и размножение. Потенциальное влияние на реакцию на молекулярном, клеточном или тканевом уровнях, или на развитие или поведенческие эффекты обычно не учитывают. Растет беспокойство и споры относительно необходимости включать, например, поведенческие эффекты, особенно для психоактивных препаратов, и другие нестандартные экотоксикологические конечные точки.

В соответствии с действующей нормативно-правовой базой лекарственные препараты для людей разрешены к применению пациентами независимо от их потенциальной экологической опасности и риска. Это уникальная нормативно-правовая позиция для любого класса химических веществ, где автоматически предполагается, что польза для общества, например, медицины, перевешивает потенциальное воздействие на окружающую среду; это также исключение, которое подлежит более тщательному изучению и в настоящее время оспаривается [1].

Цель выпускной квалификационной работы – оценка влияния фармацевтического препарата вортиоксетина на плавательную активность дафний в условиях различной освещенности.

Задачи:

1. В рамках НИОКР по созданию модернизированного анализатора токсичности «TrackTox» охарактеризовать условия освещенности, создаваемые прибором.
2. Охарактеризовать параметры плавательной активности *Daphnia magna* при различных условиях освещенности при помощи разработанного программно-аппаратного комплекса.
3. Оценить влияние препарата вортиоксетина на плавательную активность дафний в условиях различной освещенности.

Объект исследования: *Daphnia magna*.

Предмет исследования: поведенческие характеристики *Daphnia magna* в нормальных условиях и при добавлении фармацевтического препарата вортиоксетина и воздействии света различной интенсивности.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фармацевтические препараты в окружающей среде

С древних времен люди использовали природные ресурсы для лечения болезней. Действительно, археологические данные свидетельствуют о том, что природные антибиотики и слабительные средства уже использовались в доисторические времена [2], и первые документы египетской и китайской медицины отмечены более 3000 лет назад. Однако к середине девятнадцатого века возникла современная медицина. С появлением таких наук как фармакология и органическая химия, началось образование фармацевтических компаний [3]. С тех пор они превратились в глобальные предприятия, которыми они являются сегодня, внося огромнейший вклад в увеличение продолжительности жизни во всем мире. Первоначальный эмпирический химический поиск новых фармацевтических препаратов сместился в сторону целевого биологического подхода, в котором новые фармацевтические препараты разрабатываются, а не обнаруживаются. В настоящее время используется около 1500 активных фармацевтических ингредиентов [4], многие из которых мы пока не можем обнаружить в экологически значимых концентрациях в окружающей среде.

С ростом населения и старением люди испытали беспрецедентный всплеск различных хронических заболеваний. Одним из следствий этого глобального явления является значительное увеличение объема и количества потребляемых людьми фармацевтических препаратов. Например, в странах ОЭСР в период с 2000 по 2015 год потребление антигипертензивных препаратов и использование препаратов, снижающих уровень холестерина, увеличилось почти в 2 и 4 раза соответственно. Поэтому неудивительно, что многочисленные активные фармацевтические ингредиенты (АФИ) человека попадали в окружающую среду до или после

использования человеком и часто обнаруживались в поверхностных, подземных и даже питьевых водах по всему миру [5].

Основными источниками фармацевтических остатков, идентифицированных в окружающей среде, являются главным образом экскреция от человека после медикаментозного лечения [6] и те препараты, которые выбрасываются неиспользованными. Несмотря на очистку сточных вод, многие человеческие АФИ обнаруживаются в окружающей среде, потому что очистные сооружения, как правило, не оптимизированы для удаления различных типов фармацевтических препаратов [7].

Использование активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) увеличивается во всем мире благодаря расширяющемуся выбору предлагаемых методов лечения, повышению доступности и доступности в сочетании с ростом населения, большая часть которого увеличивается в возрасте [8]. Считается, что основным источником появления АФИ в окружающей среде является употребление человеком фармацевтических препаратов, большинство из которых используются, выделяются и сбрасываются в систему сточных вод. Из-за сложности и стоимости мониторинга микроконцентраций веществ в компонентах окружающей среды и в некоторых случаях из-за отсутствия законодательства для регулирования, возможность прогнозирования негативных последствий может быть ограничена. Следовательно, все более пристальное внимание уделяется уровням АФИ, поступающим и сбрасываемым с очистных сооружений [9].

Кроме того, степень удаления АФИ во время очистки сточных вод может быть ограничена. Скорость удаления активных фармацевтических ингредиентов зависит от концентраций, поступающих на завод, их химической структуры, растворимости, заряда, потенциальной токсичности и наличия жизнеспособных бактерий с необходимыми катаболическими / биоразлагающими свойствами. Следует отметить, что конкретные механизмы удаления являются очень сложными, и во многих

случаях вклад отдельных факторов плохо изучен. Предыдущие исследования показали, что эффективность удаления АФИ может варьироваться в зависимости от технологий обработки очистных сооружений и даже в рамках определенных работ. Следовательно, качество стоков очистных сооружений в настоящее время представляет интерес для фармацевтической промышленности, которая ищет более совершенные оценки рисков [10].

В настоящее время на европейском рынке сообщается о наличии более 5000 фармацевтически активных веществ [11]. Сотни этих веществ были обнаружены в европейских поверхностных водах в концентрациях, обычно варьирующихся от нг/л до мг/л. Поскольку фармацевтические препараты предназначены для биологической активности и для достижения определенных терапевтических эффектов, их присутствие в поверхностных водах может оказывать неблагоприятное воздействие на водные организмы. Это стало очевидным в сообщаемых эффектах, таких как эндокринные нарушения; нарушение репродуктивной функции; изменения в нересте и усиление устойчивости микроорганизмов. Кроме того, гидролиз, фотолиз и биодеградация могут давать продукты трансформации с отдельным токсикологическим эффектом [12]. Поэтому воздействие лекарственных препаратов на окружающую среду, а в частности на представителей водных организмов вызывает растущую обеспокоенность, что приводит к тому, что Европейское агентство по лекарственным средствам (ЕАЛС) разрабатывает руководящие документы для оценки риска для окружающей среды и создает постоянно растущий массив экотоксикологических данных для фармацевтических препаратов. Европейский союз (ЕС) также признал потенциальное вредное воздействие таких веществ, включив диклофенак, 17b-эстрадиол и 17a-этинилэстрадиол в Контрольный список рамочной директивы по воде (РДВ), что делает их кандидатами на будущий регулярный мониторинг. Тем не менее, помимо этих трех веществ, другие фармацевтические препараты в настоящее время

не подпадают под действие экологических норм ЕС, что приводит к очень ограниченной информации об их появлении.

Когда сведения о концентрации веществ в окружающей среде недоступны или ограничены, их можно прогнозировать с помощью инструментов моделирования. Модели особенно полезны, если необходимо прогнозировать появление во времени и в пространстве, поскольку существующие данные о фармацевтических препаратах в воде редко имеют хороший пространственный и временной охват [13].

1.2 Мультимедийные модели прогнозирования

В настоящее время многие фармацевтические препараты были обнаружены в поверхностных водах по всему миру. Из-за масштабов проблемы один только мониторинг не может дать полную картину ситуации. Для осуществления качественного мониторинга и оптимальных мер по смягчению последствий воздействия могут использоваться пространственно-явные модели. Известно, что географическая изменчивость приводит к существенным различиям в воздействии фармацевтических препаратов на окружающую среду. Применение мультимедийного подхода к моделированию прогнозов показало, что в Европе у испанских детей, которые едят сельскохозяйственные культуры местного производства, самый высокий относительный риск для здоровья из-за воздействия антибиотиков на окружающую среду. Из-за (полузасушливого) климата остатки антибиотиков, содержащиеся в этом осадке, подвергаются незначительному стоку в поверхностные воды или выщелачиванию в нижние слои почвы. Это делает их доступными для поглощения сельскохозяйственными культурами и последующего потребления. Для оценок в меньших масштабах, например, для определения локальных горячих точек или проведения анализа конкретных локальных сценариев, предлагается использовать географические мультимедийные модели [14].

Прогнозируемые концентрации химических веществ в окружающей среде (PEC) могут быть получены с использованием мультимедийных моделей будущего, таких как модель EUSES. Такие модели основаны на уравнениях баланса массы для взаимосвязанных элементов, которые представляют соответствующие среды окружающей среды (например, пресные и соленые воды, воздух, городские и сельскохозяйственные почвы и т.д.), и особенно полезны для более масштабных (региональных, континентальных) оценок, где медиа могут быть актуальны. Типичным применением является географическая расстановка приоритетов фармацевтических препаратов на основе их потенциального воздействия на здоровье человека, поскольку воздействие на человека может происходить несколькими путями (например, питьевая вода, сельскохозяйственные культуры, рыба). Модели будущего окружающей среды неизменно оценивают PECs фармацевтических препаратов путем интеграции информации об использовании лекарственных средств, метаболизме человека, удалении во время очистки сточных вод, разбавлении и рассеянии в принимающих элементах окружающей среды и переносе между ними. Для оценки воздействия концентрации на человека в окружающей среде используется сочетание дополнительной информации о потенциальном поглощении химического вещества сельскохозяйственными культурами и рыбой, а также информации о характере потребления и поведении подверженной (суб) популяции [14].

Относительные риски антибиотиков в окружающей среде, основанные на их потенциальном воздействии на здоровье человека и водную среду, демонстрируют значительные географические различия по всей Европе. Из-за того, что они включают множество сред окружающей среды в относительно большом масштабе, их применимость может быть расширена относительно простым способом для включения рассеянных источников ветеринарных фармацевтических препаратов. Однако мультимедийные модели будущего менее пригодны для ответа на

локальные вопросы (например, определение горячей точки, анализ сценариев для оптимальных мер по смягчению), поскольку они предполагают однородное распределение химических веществ по своим элементам окружающей среды и не учитывают каких-либо пространственных изменений в этом масштабе [15]. Учитывая, что фармацевтические препараты в основном остаются в экологическом сфере, в которую они выбрасываются (то есть в поверхностные воды или сельскохозяйственные почвы [16]), модели с одним носителем образуют подходящую альтернативу для локальных оценок, где важна единая экологическая среды. Примерами геоинформационных моделей с одним носителем для химикатов, предназначенных для отвода стоков, являются GREATER, PhATE, GWAVA , LF2000-WQX и iSTREEM.

Мультимедийные модели прогнозирования для окружающей среды могут всесторонне решать проблемы химического загрязнения путем составления количественного отчета об источниках, процессах переноса, и стоках органических химических веществ [17]. Другими словами, они могли бы составить полноценную картину поведения органических химических веществ в окружающей среде с пространственной информацией, используя физико-химические свойства, параметры окружающей среды и скорости распространения [18]. Они используются для идентификации процессов переноса химических веществ в нескольких средах, которые обеспечивают приблизительные прогнозируемые концентрации в элементах окружающей среды и определяют их конечную точку, которые могут предоставить информацию для оценки биоакумуляции и воздействия на человека. Одним словом, мультимедийные модели окружающей среды являются полезными инструментами для химического контроля и управления, оценки рисков и последствий [19].

1.3 Вортиоксетин

Присутствие фармацевтических препаратов в окружающей среде обуславливается их высокой потребностью в наше время. Они попадают в объекты окружающей среды при производстве и потреблении. Существует неблагоприятное воздействие препаратов на природу. В частности, было показано, что нестероидный противовоспалительный препарат диклофенак вызывает резкое сокращение популяции (> 99%) у видов грифов в Индии и Пакистане, что приводит к локальному вымиранию [20]. Также, антидепрессанты были обнаружены в элементах окружающей среды, а именно в поверхностных и подземных водах. Примером может послужить распространённое заболевание – большое депрессивное расстройство (БДР). БДР считается тяжелым психическим заболеванием, которое приводит к серьезному снижению качества жизни, существенным экономическим издержкам. Для лечения БДР часто назначают вортиоксетин, который обладает фармакодинамическим профилем, отличным от всех существующих на сегодняшний день антидепрессантов, тем самым пользуется спросом среди страдающих большим депрессивным расстройством. Новый антидепрессант, вортиоксетин, механизм действия которого является мультимодальным, был одобрен для лечения БДР. Новый механизм вортиоксетина включает комбинацию ингибирования переносчика серотонина и прямой модуляции рецептора серотонина.

Способ получения

Способ получения, используемый для получения вортиоксетина и раскрытый в WO 03/029232, основан на твердофазном синтезе, и в нем используют реакции нуклеофильного ароматического замещения в диарене с помощью железа в ходе многостадийного способа. Таким образом, 4-[пиперазин-1-ил] карбонилоксиметил]феноксиметилполистирол вводили в реакцию с диареновой солью железа, т.е. η6-1,2-дихлорбензол-η5-циклопентадиенилжелеза (II) гексафторфосфатом, с последующим выделением и промыванием смолы и проведением дополнительной

реакции с 2,4-диметилтиофенолом. Наконец, полученную таким образом смолу обрабатывали 1,10-фенантролином и светом для разрушения комплекса циклопентадиенилжелеза. Общий выход был низким, только 17%.

Механизм действия

Считается, что механизм действия вортиоксетина связан с его мультимодальной активностью, которая представляет собой сочетание двух фармакологических способов действия: прямой модуляции рецепторной активности и ингибирования переносчика серотонина. Доклинические данные указывают на то, что вортиоксетин является антагонистом рецепторов 5-HT3, 5-HT7 и 5-HT1D, частичным агонистом рецептора 5-HT1B, агонистом рецептора 5-HT1A и ингибитором транспортера 5-HT, что приводит к модуляции нейротрансмиссия в нескольких системах, включая преимущественно серотонин, но, вероятно, также системы норэпинефрина, дофамина, гистамина, ацетилхолина, ГАМК и глутамата. Эта мультимодальная активность считается ответственной за антидепрессантные и анксиолитические эффекты, а также за улучшение когнитивной функции, обучения и памяти, наблюдаемых с вортиоксетином в исследованиях на животных. Однако точный вклад отдельных целей в наблюдаемый фармакодинамический профиль остается неясным, и следует проявлять осторожность при экстраполяции данных о животных непосредственно на человека.

Фармакокинетика

Вортиоксетин и связанный с ним материал в основном выводились с фекалиями у мышей (84%), крыс (69%) и собак (59-65% в двух отдельных исследованиях), тогда как у людей отмечалось значительное выделение с мочой (59%) по сравнению с фекалиями (26%). В исследованиях экскреции извлечение [14C] вортиоксетина и родственного материала было близко к 100% у грызунов. У собак и людей наблюдалась длительная экскреция, и восстановление составило приблизительно 90% и 85% через 168 и 360

часов соответственно. Экскреция в материнском молоке была продемонстрирована у крыс.

Исследования по оценке риска для окружающей среды

Исследования по оценке риска для окружающей среды показали, что вортиоксетин обладает потенциалом быть стойким, биоаккумулирующим и токсичным для окружающей среды (риск для рыб). Однако при рекомендованном применении пациентом считается, что вортиоксетин представляет незначительный риск для водной и наземной среды [21].

1.4 Поведенческий мониторинг

В начале 1900-х годов исследования поведения водных организмов были основном сосредоточены на деятельности организмов (например, дыхательный обмен). Впервые Humboldt и Provençal исследовали дыхание рыб [22]. Они помещали рыбу в колбу, наполненную водой, а затем, через определенный промежуток времени, отбиралась вода в колбе для измерения изменений состава газов из-за поглощения и выделения. Позднее аналогичные методы были применены к морским беспозвоночным. Кроме того, непосредственно наблюдались изменения в оперкулярных показателях рыб для изучения влияния изменений окружающей среды и различных токсикантов. Газообмен водных организмов измеряли путем мониторинга изменений газосодержания в закрытом сосуде с водой, содержащим различные организмы, такие как рыбы и мидии. Газообмен водных организмов также измеряли в проточных водных системах. Принцип Рено, который гласит, что можно определить природу катаболизируемых веществ, используя коэффициент дыхания, также применяется для измерения дыхательной активности водных организмов. Также было предложено устройство, которое могло записывать ритмы суточной активности, было также предложено – ихтиометр. Кроме того, несколько исследований были сосредоточены на определении основных факторов влияющих на поведение рыб в стае,

основанных на непосредственном наблюдении и кинематографическом методе; тестируемые параметры включали зрение рыб, характерное движение и химическая чувствительность. Также были рассмотрены различные факторы окружающей среды, чтобы объяснить поведение при обучении рыб, включая корм, температуру, и хлорированную воду и pH [23].

Биологические системы представляют собой иерархические структуры, состоящие из уровней, соответствующие молекулам, клеткам, тканям, органам, системам органов, организмам, популяциям, сообществам и экосистеме. Отклики на каждом уровне различаются в зависимости от условий окружающей среды. На самом низком уровне (то есть небольших структурах) используются различные аналитические методы и токсикологические анализы для оценки биологических реакций на воздействие, обеспечивая быструю и точную информацию. Тем не менее, этот тип информации имеет низкую экологическую значимость. Между тем, на уровне сообществ и экосистем ответные реакции являются медленными и часто неточными, несмотря на то что они очень экологичны, из-за накопления эффектов возмущения или стресса на системы. Поведение связано с суборганизменном уровнем, включая нейромедиаторы, ферменты плазмы, гормоны и энергетический обмен. Следовательно, поведенческие конечные точки могут быть такими же чувствительными, как биохимические и физиологические биомаркеры. Поведение может также отражаться в ответах сообщества (например, биоразнообразие и передача энергии) или населения (например, рост населения). Таким образом, мониторинг поведения животных, основанный на постоянном наблюдении за поведением при движении, представляется наиболее эффективным средством увязки оценок в малых и крупных масштабах. Поведение представляет собой реакцию организма на внутренние (физиологические) и внешние (экологические и социальные) факторы. Следовательно, поведенческие отклики – это интеграция ряда

состояний, представляющих острые кумулятивные эффекты. Поведенческие параметры в 10-100 раз более чувствительны, чем параметры выживания. Кроме того, поведенческие измерения экономичны и практичны, потому что инструменты, используемые для оценки поведения, относительно недороги.

Сублетальное воздействие определенных химических веществ вызывает широкий спектр реакций у организмов, включая генетические и поведенческие изменения. Поэтому для эффективной оценки качества воды используются биохимические изменения. Кроме того, изменения в поведении организмов являются эффективными показателями воздействия на окружающую среду, поскольку поведенческие реакции связывают как эндогенные, так и экзогенные факторы с биохимическими и физиологическими процессами. Изменения в поведении обеспечивают понимание на организменном уровне и уровне сообществ эффектов, вызванных экологическими токсикантами. Хотя поведенческий мониторинг имеет различные преимущества, по-прежнему трудно объективно количественно определить и интерпретировать поведенческие данные из-за нелинейности поведения, изменения в индивидуальном поведении и большого количества данных, полученных при непрерывном мониторинге. Таким образом, были предложены различные методы для анализа сложного поведения и применены к поведенческому мониторингу для интерпретации комплекса поведенческих данных. Хотя дальнейшие исследования необходимы для улучшения методов поведенческого мониторинга, способность количественно оценивать поведение означает, что этот фактор потенциально может быть использован как важный биомаркер в мониторинге пресной воды [24].

1.5 Автоматизированные системы биомониторинга

Согласно трудам Newman и Clements, для улучшения биомониторинга требуются инновационные методы, которые повысят эффективность без ущерба для актуальности и качества производимых данных. Технологические инновации в тестировании экотоксикологии в настоящее время позволяют исследователям изучать более широкий спектр конечных точек, которые потенциально могут быть включены в системы раннего предупреждения биомониторинга, которые могут обнаружить загрязнение питьевой воды до ее поступления в систему питьевого водоснабжения. Например, сквозной мониторинг в режиме реального времени можно использовать не только для выявления откликов намного быстрее, чем стандартные 24-часовые тесты на острую токсичность, но также для непрерывного мониторинга сточных вод. Большую информацию можно получить, разработав модели токсичности, основанные на острых сублетальных реакциях организмов на ксенобиотические стрессоры, особенно при оценке качества питьевой воды, поскольку в этой области требуются быстрые и точные ответы, которые вообще не могут быть получены с помощью химического анализа [25].

В прошлом острые тесты на токсичность обычно ассоциировались с летальностью в качестве конечной точки, тогда как хронические тесты, которые обычно длятся часть жизненного цикла организмов, были связаны с сублетальными конечными точками. Системы анализа изображений теперь могут позволить исследователям легко просматривать сублетальные конечные точки в тестах на острую токсичность способом, который автоматизирован и требует минимального контроля. Особенно в последние двадцать лет, новые технологии начали позволять исследователям более эффективно смотреть на сублетальные конечные точки на уровне организма. Достижения в области анализа изображений и других механизмов обнаружения в сочетании с проточными и онлайновыми системами позволяют получать результаты в режиме реального времени.

Этот непрерывный мониторинг поведенческих реакций может сделать эти устройства особенно полезными для организации биологических систем раннего предупреждения, которые идеально подходит для мониторинга качества питьевой воды или промышленных сточных вод [26]. Наиболее распространенные тестовые виды включают рыбу, двустворчатых моллюсков, различные виды дафний, водоросли и бактерии. Эти системы раннего предупреждения включают как анализ изображений, так и физиологических реакций.

Неоптические системы. Автоматические тесты биомониторинга без поведения с использованием микроорганизмов, обычно включаемые в набор тестов для оценки токсичности, представляют собой тест Microtox® и PAM флуорометр [26]. Флуорометр PAM анализирует фотосинтетическую активность *Pseudokirchneriella subcapitata* путем измерения флуоресценции хлорофилла, тогда как система Microtox®, коммерчески доступная с начала 1980-х годов, рассматривает биолюминесценцию *Vibrio fischeri*, также известного как *Photobacterium phosphoreum*, морская бактерия. Главная слабость системы Microtox® заключается в том, что используемые виды биоиндикаторов не имеют отношения к окружающей среде в контексте пресноводной системы. Проблемы также включают образование биопленки, непрерывный рост бактерий, низкую чувствительность и добавление питательных веществ и сред, управляющих характеристиками тестируемой, и тот факт, что эта система основана только на лабораторных условиях и не может быть реализована на месте.

Системы анализа изображений. BehavioQuant®, также известный как поведенческий тест рыб Кобленца, обычно используемый с пресноводными видами *Leuciscus idus* (язь), является одним из примеров системы анализа изображений, имеющейся в продаже сегодня и используемой в Федеральном институте гидрологии Германии [27]. Эта система анализирует поведение рыб, чтобы определить различные

параметры, такие как скорость плавания, количество поворотов и расстояния между особями, поскольку в каждой системе в камере содержится семь особей. Существуют и другие системы биомониторинга рыб с некоторыми отличиями. Некоторые предназначенные для наблюдения параметров только одной особи, а не взаимодействия между ними, и, следовательно, будут иметь только одну особь на камеру, например, систему биомониторинга рыб USACEHR, которая измеряет частоту дыхания, частоту кашля и характер движения тела. Еще одно отличие этой системы заключается в том, что она была создана для использования с определенным видом рыб – синежаберным солнечником *Lepomis macrochirus*. Так обстоит дело и с Fish Toximeter (bbe Moldaenke), еще одной системой анализа поведения рыб на основе анализа изображений, в которой специально используются рыбы-данио (*Danio rerio*), хотя могут использоваться и другие виды. BehavioQuant®, с другой стороны, был создан для использования с различными видами, причем наиболее широко использовались *D. rerio* и верховка (*Leucaspius delineatus*). Было показано, что использование рыбы в качестве биоиндикаторных организмов является недостатком из-за низкой химической чувствительности, а также из-за этических проблем.

Система анализа изображений ECOTOX. ECOTOX является одной из многих существующих сегодня систем анализа изображений, которые используются для получения информации о токсичности соединений. Это автоматическая система анализа поведения в реальном времени, которая отслеживает несколько параметров движения *Euglena gracilis*. Он основан на традиции использования биологических анализов отдельных видов для определения воздействия загрязняющих веществ на эти организмы и экстраполяции этой информации для определения воздействия этого вещества на окружающую среду. Тестируемые организмы дают ответ, который зависит от дозы, которая, в свою очередь, зависит от уровня воздействия указанного организма на испытуемое вещество. Воздействие

эквивалентно концентрациям соединения в окружающей среде; для водных организмов это будет концентрация соединения в окружающей воде. Доза соединения, которая фактически воздействует на данный организм, будет зависеть от различных внутренних факторов, таких как размер, отношение поверхности к объему, содержание жира и тип поверхностного покрытия организма, а также от внешних факторов, таких как температура, pH и гидрофобность соединения [28].

Система анализа изображений DaphniaTox. DaphniaTox работает на основе тех же принципов анализа изображений, которые используются ECOTOX, но в которых анализируется локомоторное поведение *D. magna*, а также возможно также использование других видов макробеспозвоночных, таких как *Hyalella azteca*. Это делает его хорошим потенциальным дополнением к разрабатываемой системе мониторинга питьевой воды раннего предупреждения, так как это уменьшит объем обучения персонала и, следовательно, общую стоимость системы. Это не широко используемая система; однако, измеренные принципы движения эквивалентны тем, которые измеряет Daphnia Toximeter от bbe, с некоторыми отличиями. DaphniaTox оснащен синим светодиодным индикатором для измерения фототаксической реакции *D. magna*, в то время как Daphnia Toximeter от bbe не измеряет этот параметр. Вместо этого он измеряет другие характеристики плавания *D. magna*, такие как группировка и «фрактальная размерность».

1.6 Реакция представителей Cladocera на освещение различного спектра

Фототаксис. Дафния в основном негативно фототропна и геотропна, но снижение интенсивности света обратило вспять признаки тропизма. Эта реакция сохранялась в течение нескольких минут, показывая, что дафнии проявляют лабильное поведение в отношении освещения. При освещении сбоку дафния поворачивается в сторону более ярко освещенной стороны.

Пики длины волны светочувствительности различны у разных видов: у *D. magna* они возникают при 440, 470, 520 и 640 нм; а у *D. retrocurva* они встречаются при 370, 435 и 570 нм и менее при 685 нм [29]. Порог визуальной чувствительности у дафний составляет $10^{-4} \div 10^{-5}$ лк. Ответ дафнии на освещение – динамичный. Эти реакции не являются жестко фиксированными и могут варьироваться в зависимости от изменений в окружающей среде и в зависимости от состояния животного. Снижение интенсивности света обращает эти реакции в течение короткого времени и периодические изменения фототаксических признаков также наблюдались при постоянном низком освещении. Это может быть понято как исследовательское (разведочное) поведение. Экспериментальное изменение реакции *D. magna* к освещению также наблюдали Черных и Панасюк [30]. В основном наблюдения Рингелберга были в условиях уменьшения интенсивности освещения, *D. magna* движется к источнику света; при увеличении интенсивности она движется подальше от источника. Непрерывное снижение света и интенсивности привели к плаванию вверх [31]. De Meester и Dumont определили три фенотипа *D. magna* по отношению к свету: положительный фототаксис, отрицательный фототаксис, и случайное блуждание между областями низкой и высокой интенсивности света. Они считают, что эти фенотипы должны быть определены генетически [32].

Восприятие и влияние поляризованного света. Cladocera могут обнаруживать поляризованный свет, который влияет на их ориентацию и направление движения, то есть у них проявляется поляротаксис. В водной среде источником поляризованного света является свет, отраженный клетками водорослей и другими частицами, которые являются потенциальными продуктами питания. Таким образом, чувствительность к поляризованному свету играет важную роль в получении пищи. *D. magna* и *D. pulex* собрали гораздо больше пищи в зоне поляризованного света, чем в зоне неполяризованного света той же интенсивности [33]. Было показано,

что несколько видов (как литоральные *Ceriodaphnia*, *Kurzia*, *Moina*, *Pseudochydorus* и *Simocephalus* spp., так и пелагические, *Bosmina*, *Daphnia* и *Leptodora* spp.), которые *Cladocera*, освещенные вертикальным лучом поляризованного света, плавают перпендикулярно плоскости поляризации. Громов также заметил, что *Daphnia* может различать вертикальные и горизонтальные лучи поляризованного света; в вертикальном луче движения дафнии уменьшаются вдвое [34].

Восприятие цветного света. Ewald обнаружил, что *D. pulex* чувствительна к цветному свету с двумя максимумами: в зелено-желтой и сине-фиолетовой областях [35]. Lumer подвергал *D. pulex*, *D. magna*, *Moina* и *Leptodora* градиентному ряду уровней света с разными длинами волн, но одинаковой интенсивности. Все испытанные животные двигались в направлении оранжевого света (620-640 нм). *Moina* была также привлечена зеленым светом (540 нм) примерно с той же эффективностью; второй максимум был в синем диапазоне (440 нм). Каждый протестированный вид показал свою характерную реакцию на свет. Литоральные виды *Pleuroxus truncatus* (син. *Peracantha truncata*) и *Scapholeberis mucronata* агрегированы в зоне синего света [36].

Было показано, что чувствительность сложного глаза дафнии наиболее высока к зеленому свету; он также воспринимает свет через свои кожные покровы, но максимальная чувствительность в этом случае была к сине-фиолетовым длинам волн.

У большинства кладоцерен было обнаружено четыре зрительных пигмента с максимальной чувствительностью к свету с длинами волн 370, 430, 560 и 670 нм (красный). В олиготрофных озерах среда преимущественно голубая, но во время эвтрофикации образуется более красная среда. В омматидии у *D. magna*, Smith и Macagno обнаружили четыре спектральных класса фоторецепторов с пиковой чувствительностью при 348, 434, 525 и 608 нм для дорсальной омматидии;

по сравнению, у брюшной омматидии была только небольшая разница в пиковой чувствительности [37].

Как нормальную, так и безглазую дафнию особенно привлекали желтый и зеленый свет в экспериментах. Цветовые предпочтения также изучались у *Daphnia carinata*. Для этого животных помещали в сосуд, окруженный черной бумагой, с четырьмя отверстиями, освещенными огнями разного цвета. После освещения в течение 15 минут регистрировалось распределение дафний: *D. carinata* предпочитала свет следующих цветов в порядке убывания: желтый, оранжевый, красный, фиолетовый, синий и зеленый.

D. magna показала пики светочувствительности на длинах волн 440, 470, 520 (синий) и 640 (красный) нм. Громов также наблюдал влияние длины волны света (или цвета) на двигательную активность дафний, что видно по их влечению к свету. Локомоторная активность зрелой дафнии снижалась в пределах 400-525 нм (фиолетово-зеленая) [34].

Когда представители Cladocera освещались вертикальным пучком света, для которого длина волны контролировалась при помощи цветных фильтров, они реагировали, плавая вверх, когда свет изменялся с синего на белый, и вниз, когда свет изменялся с желтого на белый. Этот ответ на изменение цвета наблюдался как у литоральной *Kurzia*, *Moina*, *Pseudochydorus*, *Sida*, и *Simocephalus*, так и у пелагических *Daphnia*, *Bosmina*, и *Leptodora*. Мойна была почти парализована внезапным воздействием синего освещения. Ответам у цериодафнии предшествовал значительный временной сбой.

При освещении сверху красным светом (около 600 нм) с равномерной интенсивностью над поверхностью аквариума *Bosmina*, *Ceriodaphnia*, *Daphnia* и *Moina*, как было замечено, обычно «танцевали» в вертикальном положении, с небольшим горизонтальным вектором в своих движениях, и, таким образом, оставались в той же области. Под синим светом (около 500 нм) эти кладоцераны были заметно взволнованы,

наклонившись вперед с большим горизонтальным вектором, и, следовательно, плавание из одного места в другое. Согласно исследованиям Stearns, дафнии имеют тенденцию двигаться вертикально между 440 нм (синий) и 735 нм (красный) и горизонтально при 440 нм (фиолетовый) и под белым светом [38].

Если свет падает на глаз *D. magna* через макушку головы, спектр действия достигает максимума на малых длинах волн, но, если он падает на глаз через боковую часть головы спектр действия достигает максимума в желто-зеленой области.

Негативное влияние синего света также наблюдается. *Sida* демонстрируют отрицательную реакцию на синий свет, а *Moina* чрезвычайно чувствительна к синему свету, будучи почти иммобилизованной им. Длительное освещение синим светом (около 500 нм) убивало кладоцер.

Эффект и восприятие ультрафиолетового излучения. Эффект ультрафиолетового излучения был изучен многими исследователями, и было показано, что ультрафиолетовое излучение серьезно угрожает *Cladocera*. Hurtubise с соавторами определили среднюю летальную дозу (LD_{50}) УФР для *Ceriodaphnia reticulata*, *D. magna*, и *Scapholeberis kingii* с использованием солнечного тренажера: LD_{50} через 96 ч варьировался от 4,2 до 84 мкВт/см^2. *Scapholebris kingii* оказались очень чувствительными, а *D. magna* и *C. reticulata* - умеренно чувствительными. *Bosmina meridionalis* не показала изменений в смертности во всем спектре ультрафиолетового излучения был проверен по сравнению с контрольной группой и в отличие от *Ceriodaphiunia dubia* и *D. carinata*. Повреждения и процессы восстановления, вызванные ультрафиолетовым излучением в *Cladocera*, могут быть взаимосвязаны. После воздействия повреждающего ультрафиолетового излучения (280-320 нм) Дафния в присутствии длинноволнового и видимого излучения продемонстрировала значительное увеличение выживаемости благодаря стимуляции фотоэнзиматической

репарации (индукции которой благоприятствует излучение УФ-А, 320-400 нм) [39].

Летальный эффект усиливался, когда *Daphnia longispina* подвергались воздействию УФ-В, а не УФ-А; воздействие УФ-А вызвало значительный окислительный стресс, как обнаружено повышенным содержанием малонового диальдегида, в то время как воздействие ультрафиолета-В сопровождалось повышением содержания как малонового диальдегида, так и каталазы. Добавление аскорбиновой кислоты снижало смертность от УФ-А, но не от УФ-В. Следовательно, что существует защитный механизм от фотоокислительного стресса. УФР также вреден для новорожденного *D. galeata* на поверхности воды, и этот эффект уменьшается с увеличением глубины. При ультрафиолетовом освещении *D. pulex* негативно фототаксичен. У *D. magna*, освещенного ультрафиолетовым светом, также наблюдается отрицательный фототаксис (при максимальной спектральной чувствительности 349 нм), тогда как фототаксис для видимого света (120-600 нм) является положительным. У многих видов, обитающих на поверхности воды и на больших высотах, развивается меланистическая окраска, вероятно, в качестве защиты от ультрафиолетового излучения. Экспериментально показано, что нисходящая миграция обеспечивает эффективную защиту *D. pulex* и *D. galeata*. Siebeck сравнил влияние УФР на *D. pulex* (светло-коричневый) и *D. galeata* (неокрашенные) и обнаружил, что первый был в 1,5 раза лучше защищен от ультрафиолета. Меланические клоны *D. pulex* и *D. middendorffiana* также выдержали воздействие 20 Вт/м^2 вблизи ультрафиолета в два раза дольше, чем непигментированные. Меланический морф *D. longispina* выжил лучше, чем гиалиновый морф (превращение) под действием солнечного ультрафиолетового излучения. Меланин в панцире уменьшает проникновение ультрафиолета [40].

В присутствии УФР большая часть *D. pulicaria* мигрирует вниз, по сравнению с образцами, экранированными от УФР [41]. Таким образом,

ультрафиолетовое излучение является фактором, который вызывает нисходящую миграцию видов дафнии, тогда как виды с более пигментированным панцирем остаются ближе к поверхности воды при воздействии ультрафиолетового излучения.

У *D. pulex* и *D. tenebrosa* также было показано, что меланин играет важную роль в защите от ультрафиолетового излучения. При отсутствии синего света и ультрафиолета дафнии не восстанавливают меланизацию панциря после линьки. Концентрация защитного меланина в дафнии увеличилась после разрушения льда в Северной Финляндии, то есть в период максимальной интенсивности подводного УФ-излучения.

У *D. catawba*, подвергшейся воздействию ультрафиолетового излучения, частота дыхания увеличилась на 31,8 % (при сублетальном облучении 2,08 кДж/м^2 в УФ ± лучах видимой фоторепарации) и снизилась на 70,3 % (при 4,16 кДж/м^2). Повышенное дыхание было связано с энергетическими затратами, связанными с восстановлением поврежденных компонентов клетки. С повышением температуры УФ-индуцированное повреждение ДНК увеличивается у *D. pulicaria* на поверхности воды, а также скорость восстановления ДНК; таким образом, чистое повреждение ДНК больше при более низких температурах, где выживаемость также может быть ниже. Поэтому фотозащита может быть более эффективной, чем фотоэнзиматическая репарация, и более эффективной при низких температурах. Ультрафиолетовое облучение *D. magna* не вызывало изменений активности каталазы и вызывало небольшое увеличение активности глутатионтрансферазы; однако при разных уровнях кислорода не было зарегистрировано никаких изменений в активности ферментов, хотя выживаемость увеличивалась при более низких температурах [42].

Активность антиоксидантов (каталаза, глутатионтрансфераза и супероксиддисмутаза) была изучена у *Daphnia* spp., чтобы оценить их роль в УФ фотозащите. В альпийских популяциях *D. longispina* была положительная корреляция между водопоглощением и каталазной

активностью, что может быть связано с фотоиндуцированным образованием перекиси водорода. Активность супероксиддисмутазы было высоким у *D. longispina* из низменного гуминового пруда. Активность глутатион-дисмутазы была низкой в группе меланического *D. pulex*. Не обнаружено различий в антиоксидантной активности альпийской меланической и непигментированной популяций *D. longispina*.

После воздействия ультрафиолета каталаза оказалась более активной в дафнии в присутствии органического вещества, тогда как для глутатионтрансферазы было показано обратное.

Сообщалось о положительной реакции на УФР (то есть излучение с длиной волны 400 нм) для литорального *Pleuroxus truncatus* (син. *Peracantha truncata*) и *Scapholeberis*. Тем не менее, *Daphnia* имела самое высокое содержание эйкозапентаеновой кислоты в прудах с самым высоким воздействием ультрафиолетового излучения, а сублетальное повреждение кишечника предшествовало смертности, вызванной ультрафиолетовым излучением [43].

Восприятие и эффект рентгеновских лучей. Облучение рентгеновскими лучами оказывает негативное влияние на кладоцер. У *Simocephalus* он уменьшает частоту дыхания и тормозит рост, возможно, за счет изменения проницаемости клеток. У молодого *Simocephalus* это также вызывает инвагинацию мешка выводка, которая становится хуже при каждой линьке.

Baylor и Smith показали, что *D. magna* нерегулярно плавают в горизонтальном пучке красного света и плавают до дна в вертикальном рентгеновском пучке; напротив, вне этого луча они всплывают обратно. Эти авторы предположили, что это действие является результатом действия свободных радикалов, вызванных рентгеновским излучением, которые по-разному воздействуют на зрительные пигменты в сложном глазу и науплиусе. Также говорится о том, что у *Moina macrocopa* облучение рентгеновскими лучами разрушительно для граней сложного глаза [44].

1.7 Мониторинг вод с использованием *Daphnia magna*

В последние годы резко возросла озабоченность по поводу присутствия и обнаружения токсичных агентов в экосистемах, в том числе в водной среде. Загрязнение воды на протяжении долгого времени оценивалось только при помощи специальных химических методов, но многолетний опыт показал недостаточность такого подхода. Использование биологических методов для оценки загрязнения водной среды показывает важную альтернативу, а именно в случаях быстрого и диффузного загрязнения, которые являются потенциальными причинами острых отравлений человека.

Для оценки и мониторинга качества воды существуют серия методик, которые в качестве основы имеют большое многообразие биоиндикаторов такие как беспозвоночные, рыбы и водоросли.

На протяжении многих лет ветвистоусый рак *Daphnia magna* Straus использовался как «стандартный» вид для тестирования качества воды. Хронические и острые пробы с *D. magna* являются одними из наиболее часто выполняемых исследований в водной токсикологии.

Различные страны используют токсикологические тесты как часть программы по мониторингу качества воды. Как правительство, так и промышленность проявляют всё больший интерес к использованию биотестов для определения токсичности химических соединений и промышленных стоков. Этот интерес проявляется в разработке более быстрых, простых и менее дорогостоящих тестов с несколькими организмами, которые обладают способностью обнаруживать присутствие токсикантов.

Так, например, Martins установил связь между референтной дозой для хронического перорального воздействия на человека (RfD) всех химических продуктов и элементов, значениями острой токсичности *D. magna* и *D. rerio.* Таким образом, они оценили возможность

использования экотоксикологических тестов с данными организмами и, что они могут быть использованы в качестве метода скрининга возможных хронических пероральных отравлений [45].

Спрос на биомониторинг также необходим для количественных краткосрочных биопроб, которые могут эффективно предсказывать долгосрочные последствия сублетальной токсичности.

Для большинства химических веществ отсутствует соответствующая информация о воздействии их на человека. Данные экспериментальных исследований с использованием лабораторных животных часто выбираются в качестве определяющей информации при проведении количественных оценок риска, так как имеющиеся человеческие данных недостаточны или не существуют для этой цели. Основные исследования взяты из экспериментов на млекопитающих, чаще всего это крысы, мыши, кролики, морские свинки, хомяки собаки или обезьяны.

Все эти результаты свидетельствуют о том, что данный опыт с *D. magna* может также дать важную и актуальную информацию о возможной хронической интоксикации полости рта человека и могут способствовать развитию методов оценки риска, не связанных с раком. Тем не менее для подтверждения этой тенденции и повышения коэффициента корреляции требуется больше данных о токсичности.

Анализ острой токсичности при помощи *D. magna* также может дать важную и актуальную информацию о возможной хронической интоксикации и может быть использован в качестве первоначального скрининга токсичности [45].

Таким образом, качественный мониторинг водных ресурсов является основополагающим для эффективного управления качеством воды и водными экосистемами в связи с вопросом о соотношении количества воды по сравнению с качеством. Первый этап в устойчивом управлении экосистемами – обнаружение нарушений, таких как токсиканты. На ранних стадиях экосистемного мониторинга, выборочная выборка, как правило,

используется для оценки экологических условий путем измерения ряда физико-химических факторов, таких как pH, растворенный кислород и биохимическая потребность в кислороде.

Благодаря достижениям как компьютерного оборудования, так и программного обеспечения наряду с информационно-коммуникационными технологиями, системы мониторинга в реальном времени постепенно разрабатываются для выявления изменений в физико-химических факторах в целевых экосистемах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для лабораторных экспериментов использовали лабораторную культуру *Daphnia magna*, выращиваемую в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06. Для культивирования использовали воду, которая соответствовала данным требованиям:

- отсутствие органических загрязняющих веществ;
- pH – 7,0-8,5 ед.;
- общая жёсткость от 80 до 250 мг/дм^3;
- отсутствие углекислого газа и др. газов;
- концентрация растворенного кислорода - не менее 6 мг/дм^3;
- температура (20 ± 2) °С;

Дафнии выращиваются в климатостате В-4 (Энерголаб, Россия), который обеспечивает поддержание искусственного освещения лампами дневного света с интенсивностью света от 1200 до 2500 лк, 16-часовой световой и 8-часовой ночной (без освещения) период; температуру (20 ± 2) °С.

Подготовка корма и кормление. Дафниям необходимо обеспечить комбинированное дрожже-водорослевое питание. В качестве водорослевого корма используется культура зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. Культура водоросли выращивается в культиваторе КВ-05 (Энерголаб, Россия) в течение 24 часов на 5 % среде Тамия. Клетки водоросли отделяют центрифугированием. Осадок разбавляют культивационной водой до концентрации 0,5-0,6 ед. оптической плотности (прибор ИПС-03). Данный способ подготовки корма допускает использование культуры водоросли хлорелла, выращенной на 50 % среде Тамия. Водорослевое кормление маточной и синхронизированной культур дафний производится через каждые 1-2 суток путем добавления в емкости с рачками указанной выше суспензии хлореллы. Количество добавляемой суспензии должно составлять около 1/20-той части объема маточной и синхронизированной культуры дафний. При этом концентрация клеток

водоросли после добавления в среду с рачками должна быть эквивалентна оптической плотности суспензии 0,02-0,03.

Для дрожжевого питания культуры рачков готовится суспензия из 1 г свежих или 0,5 г сухих хлебопекарных дрожжей в 100 $см^3$ дистиллированной воды. После набухания суспензию тщательно перемешивают. Допускается хранить дрожжевую суспензию в холодильнике 1-2 суток. Кормление дрожжами производится 1 раз в неделю путем добавления по 3 $см^3$ тщательно перемешанной дрожжевой суспензии на 1 $дм^3$ культуры рачков. Водорослевый корм в этот день дается в количестве в три раза меньше [46].

После достижения среднего размера дафний, их можно использовать для эксперимента. Проводилось два последовательных опыта – контроль и эксперимент с добавлением вортиоксетина с концентрацией 1 мг/л. Вортиоксетин был получен посредством растворения соответствующей навески лекарственного препарата Бринтелликс.

Схема исследуемого сочетания факторов (уровень освещенности и наличие фармпрепарата) представлена на рисунке 2.1, подробный порядок эксперимента отражен на рисунке 2.2 и описан ниже.

Рисунок 2.1 – Схема сочетания факторов в ходе эксперимента по изучению плавательной активности дафний

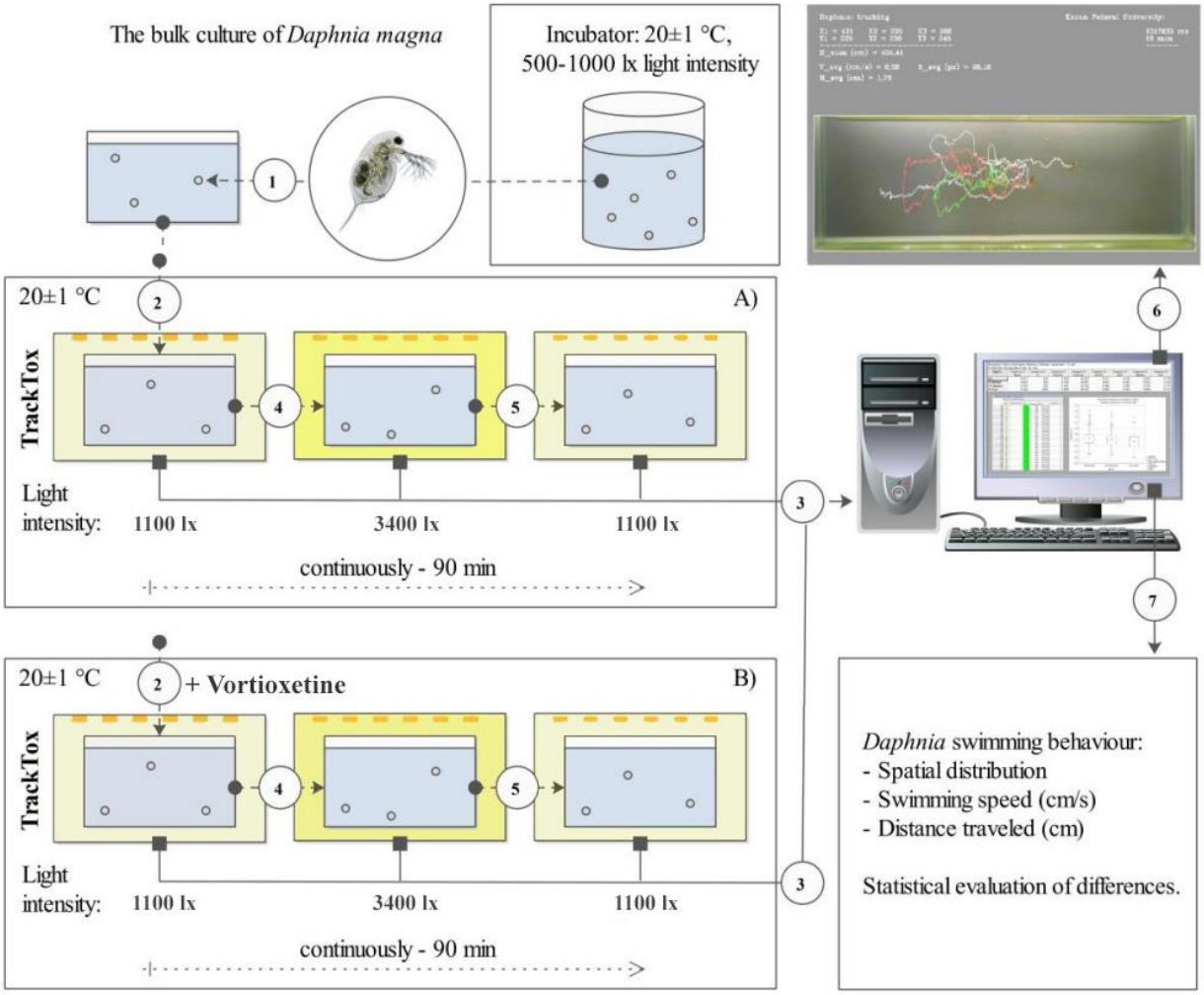

Рисунок 2.2 – Схема эксперимента по изучению плавательной активности дафний

В прозрачный пластиковый тестовый контейнер (100 × 45 × 10 мм) с 25 мл культивационной воды переносили трех дафний из маточной культуры (1). Первый этап эксперимента (А) включал изучения плавательного поведения дафний в контрольных условиях (без добавления препарата) в условиях различной освещенности (белый свет, 6500 К). Для этого камеру помещали в анализатор TrackTox (2), обеспечивающий стабильные температурные условия (20 ± 2 °C). Исходный уровень освещения составлял 1100 лк. Дафнии выдерживались 10 минут для акклиматизации к новым условиям. После чего осуществлялась запись их двигательной активности в течение 30 минут (3). Далее интенсивность

света повышалась до 3400 лк (4), и также анализировалась следующие 30 минут (3), после чего интенсивность освещения возвращалась к первоначальной – 1100 лк (5). Изучение плавательной активности в данном случае длилось так же 30 минут (3).

На втором этапе эксперимента (B) в камеру добавлялся раствор вортиоксетина в количестве достаточном для достижения концентрации 1 мг/л (2). Последующие шаги эксперимента повторяли в целом действия описанные для этапа A (за исключением 10 минутной акклиматизации). Таким образом, суммарная продолжительность эксперимента составляла 180 минут. В качестве характеристик плавательной активности изучались скорость плавания и проходимое дафниями расстояние.

Модернизированный анализатор TrackTox обладает регулируемыми параметрами – температура и освещенность. Для изучения создаваемых прибором световых характеристик измеряли интенсивность света и коэффициент пульсации при помощи люксметров – ТКА-ПКМ (Россия) и NKTECH (Китай).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica 12 (StatSoft, США). Результаты представлены в виде количества наблюдений (N), среднего (Mean), минимума и максимума (Minimum, Maximum), стандартного отклонения (Std.Dev.; SD) и стандартной ошибки среднего (Std.Err.; SE).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная выпускная квалификационная работа является продолжением курсовой работы «Оценка влияния интенсивности освещения на плавательную активность дафний», выполненной в 2019 году [47]. В ее рамках было показано изменение плавательной активности *D. magna* в ответ на световой фактор различной интенсивности. Разработка нового усовершенствованного анализатора токсичности потребовала проверки ряда физических характеристик, регулируемых прибором.

Перед началом эксперимента измерили интенсивность света в модернизированном анализаторе TrackTox, используя два разных люксметра (ТКА-ПКМ, NKTECH) имеющих разную чувствительность. Были составлены сравнительные таблицы для белого (табл. 3.1), красного (табл. 3.2) и синего (табл. 3.3) спектра света, создаваемого прибором. Также измерили коэффициент пульсации при помощи прибора ТКА-ПКМ.

Для белого света анализатор обеспечивает регулируемую интенсивность освещения в диапазоне 4-3412 лк, для красного света – 6-1625 лк, для синего света – 0-386 лк соответственно.

Таблица 3.1 – Показания люксметров-пульсметров для белого света в модернизированном анализаторе TrackTox

Интенсивность	ТКА-ПКМ		NKTECH
	Е(лк)	Кп(%)	Е(лк)
0	3,64	86,5	1,6
45	307,4	6,4	317,4
90	1112,1	3,6	1146,2
135	1713,56	2,7	1736,8
180	2445,96	2,3	2479,8
225	3066,04	1,0	3082
270	3424,58	0,4	3438
315	3412,8	0,2	3414

Таблица 3.2 – Показания люксметров-пульсметров для красного света в модернизированном анализаторе TrackTox

Интенсивность	ТКА-ПКМ		NKTECH
	Е(лк)	Кп(%)	Е(лк)
0	5,6	54,8	3,0
45	122,52	7,1	115,6
90	521,1	3,6	485,4
135	804,58	2,6	748,8
180	1108,04	1,7	1101,4
225	1369,12	1,0	1274,0
270	1554,18	0,2	1499,8
315	1625,16	0,2	1510,6

Таблица 3.3 – Показания люксметров-пульсметров для синего света в модернизированном анализаторе TrackTox

Интенсивность	ТКА-ПКМ		NKTECH
	Е(лк)	Кп(%)	Е(лк)
0	0	0	0
45	8,1	40,5	29,4
90	106,2	5,4	426,6
135	189,9	3,1	766
180	259,18	2,2	1104,4
225	315,82	1,8	1270
270	384,18	0,9	1540,4
315	386,08	0,9	1548,4

Примечание: Интенсивность – величина угла поворота ручки переменного резистора (потенциометра) от положения минимального значения, соответствующая разному напряжению, подаваемому на светодиоды. Е – уровень освещенности, Кп – коэффициент пульсации

ТКА-ПКМ оказался чувствительнее при красном свете, а NKTECH при синем. В то же время приборы показывали относительно одинаковые значения при белом свете. Используемые в конструкции прибора светодиоды обеспечивают стабильное освещение без существенных пульсаций, что важно для видеообработки. На основании данных из таблицы 3.1 выбрали значения для анализа – 1100 лк и 3400 лк.

Предварительно для выбора статистического анализа была проведена проверка на нормальность по критерию Колмогорова-Смирнова. Проверка полученных данных, по данному критерию, показала нормальное распределение. В связи с этим были использованы параметрические методы статистики для дальнейшего анализа.

Для каждого параметра плавательной активности (скорость, пройденное расстояние) определили стандартное отклонение, минимум, максимум и стандартную ошибку. Полученные в ходе эксперимента данные представлены в таблице 3.4 и 3.5.

Таблица 3.4 – Скорость плавания дафний (см/с) в контрольных условиях (1-3) и при воздействии вортиоксетина (1 мг/л; 4-6) на плавательную активность дафний в условиях различной освещенности

Этап эксперимента		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Std.Err.
Контроль	1 - 1100 лк	90	0 ,39	0 ,23	0 ,59	0 ,09	0 ,01
	2 - 3400 лк	90	0 ,41	0 ,25	0 ,86	0 ,09	0 ,01
	3 - 1100 лк	90	0 ,40	0 ,19	0 ,62	0 ,10	0 ,01
Вортио-ксетин	4 - 1100 лк	90	0 ,48	0 ,22	0 ,68	0 ,08	0 ,01
	5 - 3400 лк	90	0 ,52	0 ,38	0 ,66	0 ,06	0 ,01
	6 - 1100 лк	90	0 ,46	0 ,34	0 ,55	0 ,04	0 ,00

Таблица 3.5 – Проплываемое расстояние дафниями (см) в контрольных условиях (1-3) и при воздействии вортиоксетина (1 мг/л; 4-6) на плавательную активность дафний в условиях различной освещенности

Этап эксперимента		N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Std.Err.
Контроль	1 - 1100 лк	90	23,25	13,89	35,46	5,47	0,63
	2 - 3400 лк	90	24,71	15,12	51,59	5,32	0,56
	3 - 1100 лк	90	24,01	11,63	37,39	5,78	0,61
Вортио-ксетин	4 - 1100 лк	90	28,61	13,24	40,62	4,85	0,51
	5 - 3400 лк	90	31,16	22,97	39,41	3,35	0,35
	6 - 1100 лк	90	27,64	20,11	32,74	2,45	0,26

На рисунке 3.1 представлена скорость плавания дафний во время контрольных наблюдений в нормальных условиях и при добавлении препарата вортиоксетина. Можно отметить, что средняя скорость дафний изменялась при повышении уровня освещенности. При увеличении интенсивности освещения с 1100 лк до 3400 лк увеличивалась скорость плавания дафний. В условиях контроля скорость увеличивалась на 5 % до 0,41 см/с и потом снижалась до 0,40 см/с при возвращении исходного уровня освещения. В опыте с препаратом, во время увеличения уровня освещенности с 1100 лк до 3400 лк возрастала средняя скорость дафний на 8 % с 0,48 см/с до 0,52 см/с и потом снижалась до 0,46 см/с. В рамках контрольного этапа и этапа с вортиоксетином указанные изменения не носили статистически значимый характер.

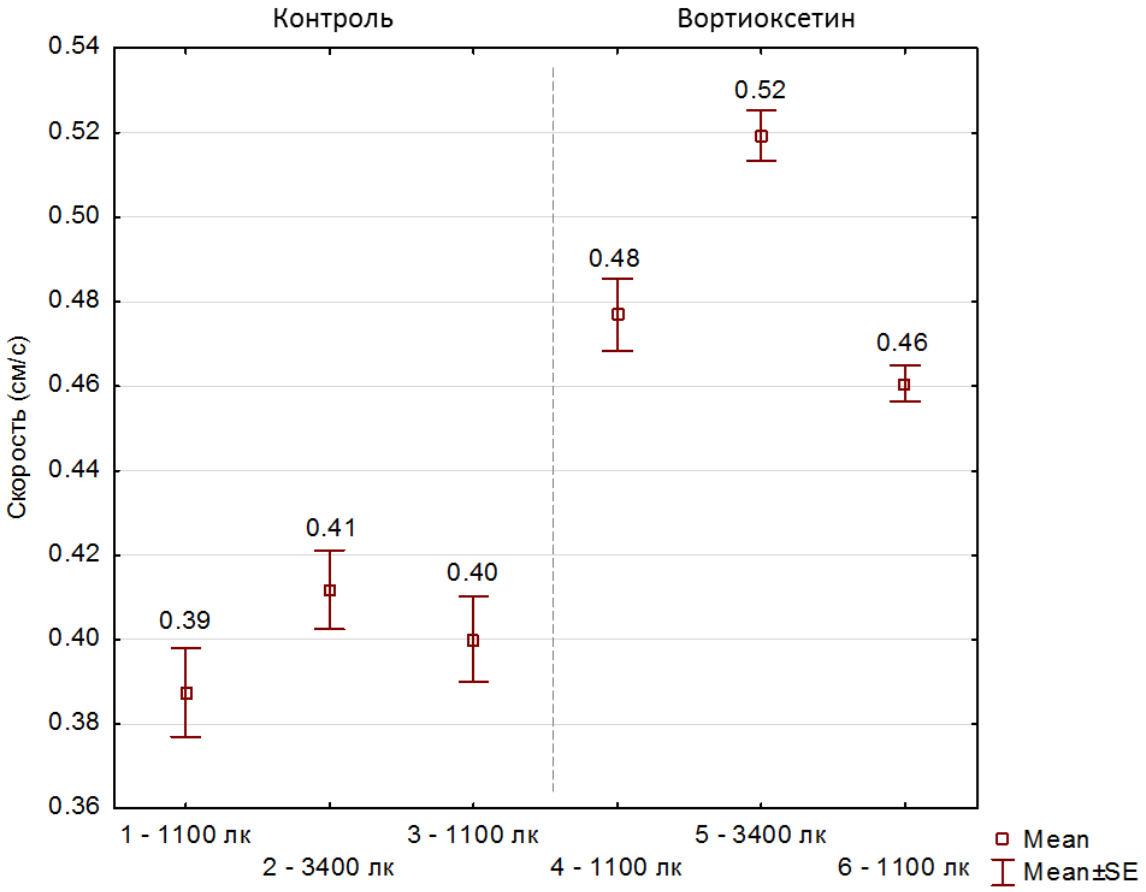

Рисунок 3.1 – Скорость плавания дафний (см/с) в контрольных условиях (1-3) и при воздействии вортиоксетина (1 мг/л; 4-6) в условиях различной освещенности

Средняя скорость в контрольных условиях в среднем составляла 0,40 см/с, а при воздействии вортиоксетина возрастала до 0,49 см/с (рисунок 3.2). При добавлении препарата средняя скорость увеличивалась на 22,5 % в сравнении с контрольными условиями. При этом подобное увеличение носило статистически значимый характер (таблица 3.6).

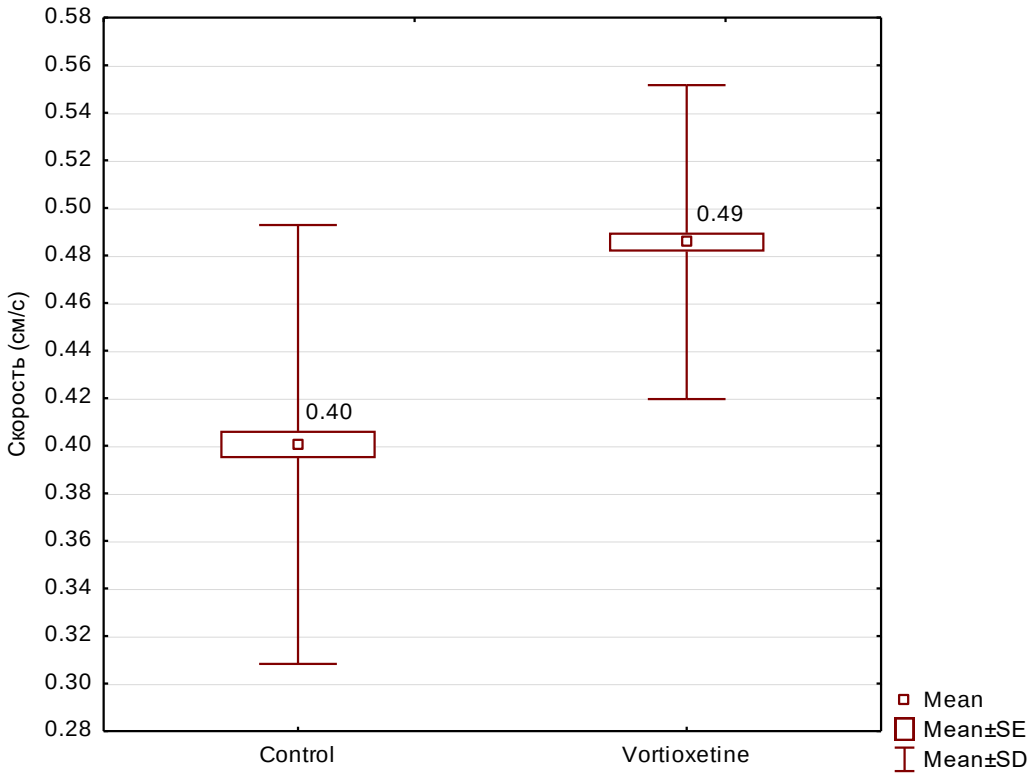

Рисунок 3.2 – Средняя скорость плавания дафний (см/с) в контрольных условиях и при воздействии вортиоксетина

Таблица 3.6 – Сравнение средних скоростей плавания дафний (см/с) в контрольных условиях и при воздействии вортиоксетина по критерию Стьюдента

	$Mean^{К}$	$Mean^{В}$	t-value	df	p
Скорость (см/с)	0,40	0,49	-12,20	538	0,000000

Среднее проплываемое одной дафнией за минуту расстояние возрастало с увеличением уровня освещенности (рисунок 3.3). При

увеличении интенсивности света в контрольных условиях с 1100 лк до 3400 лк среднее проплываемое расстояние возрастало на 6 % с 23,25 до 24,71 см, а потом снижалось до 24,01 см. При увеличении уровня освещенности с 1100 лк до 3400 лк в случае использования препарата вортиоксетина пройденное расстояние увеличивалось на 9 % с 28,61 до 31,16 см, а потом снова снижалось до 27,64 см при уровне освещенности равному 1100 лк. Среднее расстояние в контрольных условиях составляло 24,03 см, а при воздействии вортиоксетина – 29,14 см. При добавлении препарата расстояние, проплываемое дафниями, в среднем статистически значимо увеличивалось на 21,2 % (рисунок 3.4).

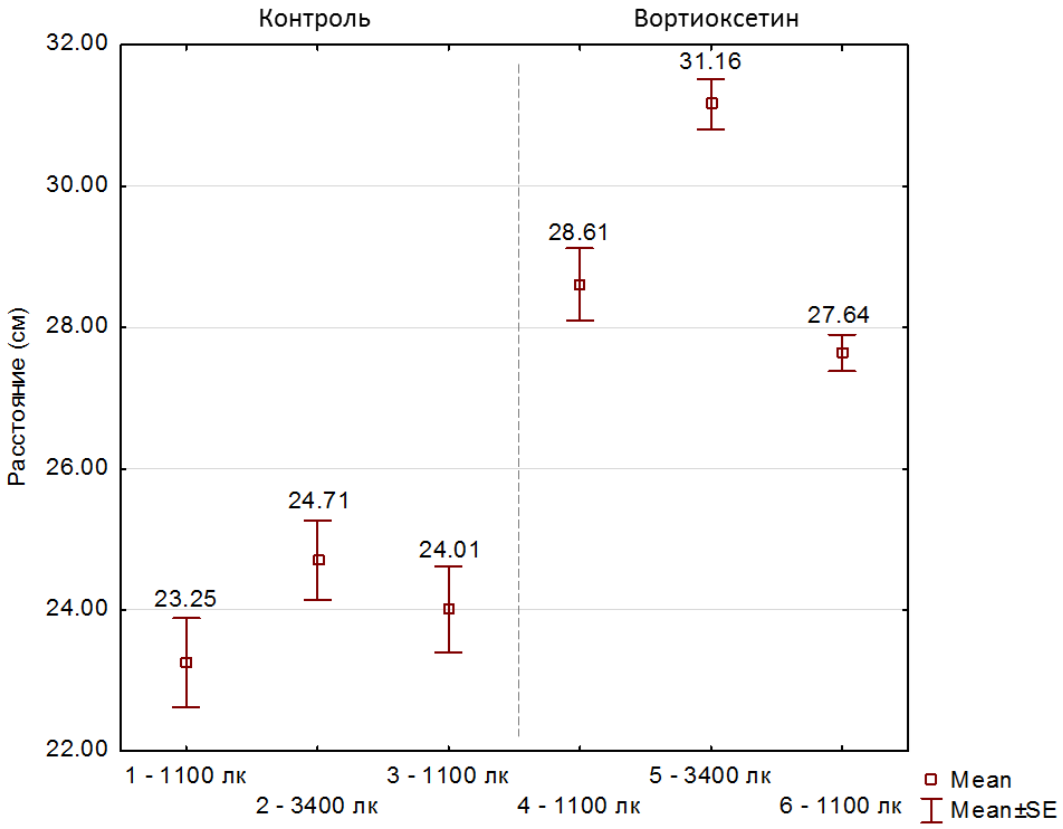

Рисунок 3.3 – Проплываемое расстояние дафниями (см) в контрольных условиях (1-3) и при воздействии вортиоксетина (1 мг/л; 4-6) в условиях различной освещенности

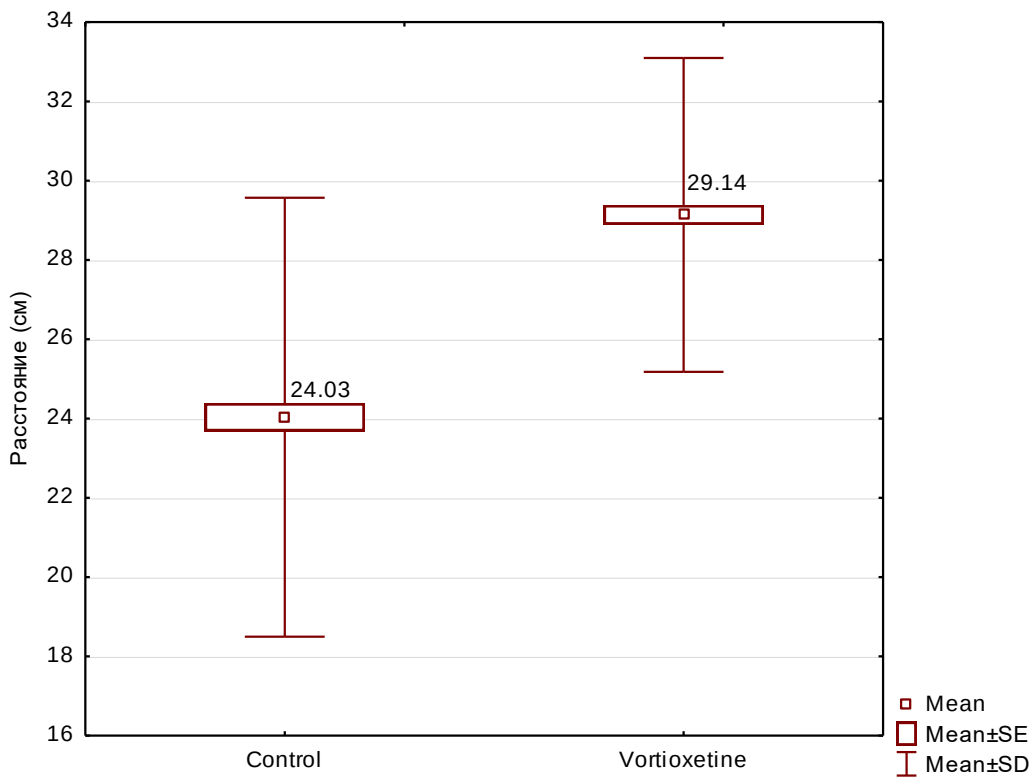

Рисунок 3.4 – Среднее проплываемое расстояние дафниями (см) за минуту в контрольных условиях и при воздействии вортиоксетина

Таким образом, в ходе выполненных исследований было показано влияние препарата вортиоксетина на плавательную активность *Daphnia magna* в условиях различной освещенности. Увеличение освещенности приводит к росту плавательной активности, которая возвращается в исходное состояние при возврате к изначальному уровню интенсивности света. Это может быть использовано в дальнейшем при моделировании различных схем экспериментов со световым фактором. Воздействие вортиоксетина оказывает значимый стимулирующий эффект на плавательное поведение. При этом характер изменения активности, при росте освещенности, оказывается похож на таковой в контрольных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Модернизированный анализатор токсичности TrackTox позволяет создавать условия освещенности различного спектра и интенсивности. Для белого света анализатор обеспечивает регулируемую интенсивность освещения в диапазоне 4-3412 лк, для красного света – 6-1625 лк, для синего света – 0-386 лк соответственно.

2. При увеличении интенсивности освещения с 1100 лк до 3400 лк световой фактор оказывал незначительное влияние на скорость плавания в условиях контроля (скорость увеличивалась с 0,39 до 0,41 см/с) и при воздействии препарата вортиоксетина (скорость возрастала с 0,48 до 0,52 см/с); пройденное расстояние увеличивалось в случае контроля с 23,35 до 24,71 см, а при добавлении вортиоксетина с 28,61 до 31,16 см соответственно. При возвращении уровня освещения к прежним значениям (1100 лк), плавательная активность принимала исходные значения.

3. Выявлено значимое влияние препарата вортиоксетина в концентрации 1 мг/л на плавательную активность дафний. Скорость плавания увеличивалась на 22,5 % (с 0,40 до 0,49 см/с), среднее проплываемое расстояние возрастало на 21,2 % в сравнении с контрольными условиями (с 24,03 до 29,14 см).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ågerstrand, M. Improving environmental risk assessment of human pharmaceuticals. / M. Ågerstrand, C. Berg, B. Bjorlenius, M. Breitholtz, B. Brunstrom, J. Fick, L. Gunnarsson, D. G. J. Larsson, J. P. Sumpter, M. Tysklind, C. Ruden // Environ. Sci. Technol. – 2015. – Vol. 49. – P. 5336–5345.
2. Capasso, L. 5300 years ago, the ice man used natural laxatives and antibiotics / L. Capasso // Lancet. – 1998. – Vol. 352 (9143). – P. 1864.
3. Winquist, R. J. The fall and rise of pharmacology – (Re-) defining the discipline / R. J. Winquist, K. Mullane, M. Williams // Biochem. Pharmacol. – 2014. – Vol. 87 (1). – P. 4–24.
4. Kinch, M. S. An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827–2013 / M. S. Kinch, A. Haynesworth, S. L. Kinch, D. Hoyer // Drug Discov. – 2014. – Vol. 19 (8). – P. 1033–1039.
5. Ferrari, B. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? / B. Ferrari, R. Mons, B. Vollat, B. Fraysse, N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio, J. Garric // Environ. Toxicol. Chem. – 2004. – Vol. 23 (5). – P. 1344–1354.
6. Taylor, D. Human pharmaceutical products in the environment – the “problem” in perspective / D. Taylor, T. Senac // Chemosphere. – 2014. – Vol. 115. – P. 95–99.
7. Hernando, M. D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. / M. D. Hernando, M. Mezcua, A. R. Fernandez-Alba, D. Barcelo // Talanta. – 2006. – Vol. 69 (2). – P. 334–342.
8. Jelic, A. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. / A. Jelic, M. Gros, A. Ginebreda, R. Cespedes-Sánchez, F. Ventura, M. Petrovic, D. Barcelo // Water Res. – 2011. – Vol. 45 (3). – P. 1165–1176.

9. Comber, S. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: a cause for concern? / S. Comber, M. Gardner, P. Sorme, D. Leverett, B. Ellor // Sci. Total Environ. – 2018. – Vol. 613–614. – P. 538–547.
10. Gardner, M. Performance of UK wastewater treatment works with respect to trace contaminants. / M. Gardner, V. Jones, S. Comber, M. Scrimshaw, T. Coello-Garcia, E. Cartmell, J. Lester, B. Ellor // Sci. Total Environ. – 2013. – Vol. 456–457. – P. 359–369.
11. Hughes, S. R. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. / S. R. Hughes, P. Kay, L. E. Brown // Environ. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 47. – P. 661–677.
12. Hirte, K. New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater. / K. Hirte, B. Seiwert, G. Schüürmann, T. Reemtsma // Water Res. – 2016. – Vol. 88. – P. 880–888.
13. Petrie, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. / B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern // Water Res. – 2015. – Vol. 72. – P. 3–27.
14. Oldenkamp, R. The boomerang effect – environmental exposure of pharmaceuticals / R. Oldenkamp // Sustain. Chem. Pharm. – 2019. – Vol. 12. – P. 1-2.
15. Pistocchi, A. Spatially explicit multimedia fate models for pollutants in Europe: state of the art and perspectives. / A, Pistocchi, D. A. Sarigiannis, P. Vizcaino // Sci. Total Environ. – 2010. – Vol. 408 (18). – P. 3817–3830.
16. Żukowska, K. Evaluating the environmental fate of pharmaceuticals using a level III model based on poly-parameter linear free energy relationships. / B. Żukowska, K. Breivik, F. Wania // Sci. Total Environ. – 2006. – Vol. 359 (1–3). – P. 177–187.
17. MacLeod, M. The state of multimedia mass-balance modeling in

environmental science and decision-making. / M. MacLeod, M. Scheringer, T. E. McKone, K. Hungerbuhler // Environ. Sci. Technol. – 2010. – Vol. 44. – P. 8360–8364.

18. Dale, A.L. Modeling nanomaterial environmental fate in aquatic systems. / A. L. Dale, E. A. Casman, G. V. Lowry, J. R. Lead, V. Enrica, B. Mohammed // Environ. Sci. Technol. – 2015. – V. 49. – P. 2587.
19. Zhang, Q. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. / Q. Zhang, G. Ying, C. Pan, Y. Liu, J. Zhao // Environ. Sci. Technol. –2015. – V. 49. – P. 6772–6782.
20. Oaks, J. L. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. / J. L. Oaks, M. Gilbert, M. Z. Virani, R. T. Watson, C. U. Meteyer, B. A. Rideout, H. Shivaprasad, S. Ahmed, M. J. I. Chaudhry, M. Arshad // Nature. – 2004. – V. 427. P.630–633.
21. Ruhland, T., Smirh, G.P., Bang-Andersen, B., et al. (2003). Phenyl-piperazine derivatives as serotonin reuptake inhibitors. H. Lundbeck A/S. WO 03/029232 A1. Denmark.
22. Humboldt, A. Recherches sur la respiration des poissons / A. Humboldt, J-M. Provençal // Mém Phys Chim Soc d'Arcueil. – 1809. – Vol. 2. – P. 559.
23. Regnault, V. Recherches chimiques sur la respiration desanimaux des diverses classes / V. Regnault, J. Reiset // Ann Chim Phys Ser 3. – 1849. – Vol. 26. – P. 299–519.
24. Beitinger, T. L. Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes / T. L. Beitinger // J Great Lakes Res. – 1990. – Vol. 16. – P. 495–528.
25. Newman, M. C. Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment / M. C. Newman, W. H. – Clements Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor, Francis Group, 2008. – 880 p.
26. Durand, A. M. Toxicity measurements in concentrated water samples. Evaluation and validation: Report 607013010/2009 / A. M. Durand, S. Rotteveel, M. T. Collombon, E. van der Grinten, J. L. Maas, W. Verweij –

Bilthoven, the Netherlands: RIVM, 2009. – 113 p.

27. Butterworth, F. M. Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change 2: a handbook / F. M. Butterworth, A. Gunatilaka, M. E. Gonsebatt. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. – 508 p.
28. Landis, W. G. Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems / W. G. Landis, M.-H. Yu. – Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. – 390 p.
29. McNaught, D. C. Depth control by planktonic cladocerans in lake Michigan, great lakes research division / D. C. McNaught // University of Michigan. – 1966. – Vol. 15. – P. 98–108.
30. Chernykh, S. I. Distribution of *Daphnia magna* under conditions of temperature, oxygen, and illumination gradients / S. I. Chernykh, T. D. Panasyuk // Zoologicheskii Zhurnal. – 1964. – Vol. 43(11). – P. 1715–1716.
31. Ringelberg, J. Light induced behaviour in Daphnia / J. Ringelberg // Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia. – 1987. – Vol. 45. – P. 285–323.
32. De Meester, L. The genetics of phototaxis in *Daphnia magna*: existence of three phenotypes for vertical migration among parthenogenetic females / L. De Meester, H. J. Dumont // Hydrobiologia. – 1988. – Vol. 162. – P. 47–55.
33. Verkhovskaya, I. Influence of polarized light on phototaxis of some organisms / I. Verkhovskaya // Bulleten Moskovskpogo Obshchestva Ispytatelei Prirody, Biol. – 1940. – Vol. 49. (3–4). – P. 101–113.
34. Gromov, A. E. Influence of light with different wavelength on phototaxis of Daphnia / A. E. Gromov // Gidrobiologicheskii Zhurnal. – 1992. – Vol. 28 (4). – P. 63–67.
35. Ewald, W. F. Versuche zur Analyze der Licht- und Farbenreactonen eines Wirbellosen (Daphnia pulex). Zeitschrift fűr Psychologie und Physiologie

der Sinnesorgane / W. F. Ewald // Zeitschrift für Sinnesphysiologie. – 1914. –Vol. 48 B. – P. 285–324.

36. Lumer, H. The reactions of certain Cladocera to colored lights of equal intensity / H. Lumer // Ohio J. Sci. – 1932. – Vol. 32(3). – P. 218–231.
37. Smith, K. C. UV photoreceptors in the compound eye of *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda). A fourth spectral class in single ommatidia / K. C. Smith, E. R. Macagno // J. Comp. Physiol. A. – 1990. –Vol. 166. – P. 597–606.
38. Stearns, S. C. Light responses of Daphnia pulex / S. C. Stearns // Limnol. Oceanogr. – 1975. –Vol. 20 (1). – P. 564–570.
39. Hurtubise, R. D. The effects of ultraviolet-B radiation on freshwater invertebrates: experiments with a solar simulator / R. D. Hurtubise, J. E. Havel, E. E. Little // Limnol. Oceanogr. – 1998. –Vol. 43 (6). – P. 1082–1088.
40. Siebeck, O. Ultraviolet tolerance of planktonic crustaceans. Verhandl. Internat. Vereining / O. Siebeck // Limnol. – 1978. – Vol. 20. – P. 2469–2473.
41. Leech, D. M. Effects of ultraviolet radiation on the seasonal vertical distribution of zooplankton: a database analysis. Archiv / D. M. Leech, C. E. Williamson, R. E. Moeller, B. R. Hargrave // für Hydrobiol. – 2005. – Vol. 162 (4). – P. 445–464.
42. Smirnov, N. N. Physiology of the *Cladocera* / N. N. Smirnov. – London: Academic Press, 2013. – 352 p.
43. Zellmer, I. D. Evidence of sublethal damage in Daphnia (Cladocera) during exposure to UV radiation in subarctic ponds / I. D. Zellmer, M. Arts, D. Abele, K. Humbeak // Arctic, Antarctic, Alpine Res. – 2004. – Vol. 36 (3). – P. 370–377.
44. Baylor, E. R. Extra-ocular polarization analysis in the honeybee / E. R. Baylor, F. E. Smith // Anat. Rec. – 1958. – Vol. 132. – P. 411–412.
45. Martins, J. Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator

of toxicants in the aquatic environment / J. Martins, M. L. Soares, M. L. Saker, L. Oliva-Teles, V. M. Vasconcelos // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2007. – Vol. 67. – P. 417–422.

46. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06. Токсикологические методы контроля. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета. – М.: ФБУ «ФЦАО», 2014. – 40 с.

47. Оценка влияния интенсивности освещения на плавательную активность дафний: курсовая работа / А. А. Калинина; научн. рук. О. В. Никитин. – Казань, КФУ. – 38 с.