

ТОКСИЧНОСТЬ И БИОКОНЦЕНТРАЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В МОРСКИХ ЗВЕЗДАХ *ASTERIAS RUBENS*: МЕХАНИСТИЧЕСКИЙ ПОДХОД И МОДЕЛИРОВАНИЕ

В.А. Федюнин, А.А. Поромов

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
г. Москва, Россия, e-mail: aap1309@gmail.com

В работе в ходе токсикологических экспериментов с тяжелыми металлами описаны изменения на уровне клеток целомической жидкости морских звезд *Asterias rubens*, по окончанию эксперимента определено содержание тяжелых металлов в телах морских звезд. Показано, что медь является наиболее токсичным металлом. Соотношение целомочитов различных субпопуляций определяется способом адаптации морских звезд к конкретному металлу (накопление металла в организме или его выведение). Способность к биоконцентрации уменьшается в ряду $Pb > Cu > Fe > Mn > Cd > Co$.

Ключевые слова: морские звезды, *Asterias rubens*, целомочиты, тяжелые металлы, токсичность, биоконцентрация

Введение

При анализе и оценке качественного состояния, экологического благополучия морских водных объектов возникает множество вопросов, связанных с их многокомпонентностью, сложностью взаимодействия отдельных элементов, разнообразием протекающих в массе морской воды процессов, значительной изменчивостью под влиянием естественных и антропогенных факторов, различием в испытываемых нагрузках и условиях использования и т.д. [Патин, 2004].

Биодоступность и токсичность многих веществ для морских организмов зависят от их физической и химической формы, рН и солености морской воды и отличаются от пресных вод [Coteur и др., 2003]. Модели, позволяющие прогнозировать токсические эффекты и биоконцентрацию металлов, разработаны для пресноводных организмов, го для применения их к морским организмам должны быть модифицированы с учетом особенностей морской среды.

Иглокожие, древнейшие представители группы *Deuterostomia*, перспективны в качестве тест-объекта в связи с их высокой экологической значимостью. На разных уровнях биологической организации иглокожих (от субклеточного до организменного уровня) возможно изучение токсических эффектов загрязняющих веществ [Coteur и др., 2003]. Важную роль в регенерации и защитных реакциях иглокожих от различного рода повреждений и инфекций выполняют целомочиты (амебоциты). Целомочиты циркулируют в составе целомической жидкости и способны к фагоцитозу инородных частиц и образованию агрегатов в зонах существенных повреждений тела, затрагивающих целомические каналы [Козлова, Петухова, Пинаев, 2006]. Целомочиты иглокожих выбраны, как клеточная модель благодаря простоте выделения первичных клеточных линий, эти клетки предположительно проявляют схожий ответ на действие поллютантов как в условиях целого организма, так и в условиях клеточной культуры *in vitro*, что связано с практически свободной циркуляцией воды между окружающей средой и целомической полостью.

Хотя металлические соединения в воде не имеют молекулярной структуры, как органические вещества, количественные соотношения структура-активность могут быть применимы в той же мере, как и модели, описывающие биоконцентрацию.

Цель данной работы – описать изменения в составе целомической жидкости при действии тяжелых металлов (число клеток и изменение соотношения клеток в составе различных субпопуляций), описать биоконцентрацию металлов в морских звездах.

Материал и методы

Морские звезды содержались в 20-ти литровых аквариумах в течение 10 дней с добавлением, в эксперимент было включено 18 экспериментальных групп (6 металлов по 3 концентрации), контрольная группа, и группа сравнения (проточный аквариум), по 10 морских звезд в каждой группе. В аквариумы с экспериментальными группами добавляли один из хлоридов металлов, в концентрациях согласно табл. 1. Используются следующие хлориды металлов: кобальта ($\text{CoCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), марганца ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$), железа ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), свинца (PbCl_2), кадмия ($\text{CaCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$) и меди ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$).

Табл. 1. Концентрации металлов в экспериментальных аквариумах

Концентрация, мкМ/л	Cu	Mn	Pb	Fe	Co	Cd
Не токсичная концентрация (ПДК)	0,037	0,40	0,036	0,31	0,038	0,055
10хПДК	0,37	4,00	0,36	3,09	0,38	0,55
100хПДК	3,73	40,00	3,60	30,86	3,85	5,46

На 0, 1, 3, 7 и 10 сутки измерялось число клеток методом окраски толуидиновым синим, распределение клеточных субпопуляций определялось методом окраски по Романовскому-Гимзе. На 10 сутки морские звезды высушивались, после чего в их телах измерялась концентрация металлов методом масс-спектрометрии. Статистический анализ проводился с помощью приложения R-Studio.

Результаты и обсуждение

В аквариуме с концентрацией меди равной 3,73 мкМ/л на 3 сутки погибло три морских звезды, к 10 суткам погибли все. Гибели морских звезд в других экспериментальных группах не наблюдалось.

Достоверных различий, имеющих доза-зависимый характер, по числу клеток в целомической жидкости не выявлено.

При окраске по Романовскому-Гимзе наблюдается три клеточных субпопуляции: малые клетки, которые являются клетками предшественниками, гранулоциты (Козлова, 2006) клетки с эозинофильно окрашенными гранулами в цитоплазме, предположительно способны к активному синтезу белков и участвуют в связывании ионов металлов, агранулоциты, клетки способные к активному фагоцитозу, предположительно способны поглощать комплексы металлов с белками целомической жидкости. Анализ распределение клеточных субпопуляций не показал значительных статистически достоверных различий, однако по изменениям происходящим в распределении все металлы можно разделить на две группы: первая (медь, свинец, кадмий) в которой преимущественно увеличивается доля субпопуляции агранулоцитов, и вторая (марганец, железо, кобальт), в которой преимущественно увеличивается доля гранулоцитов.

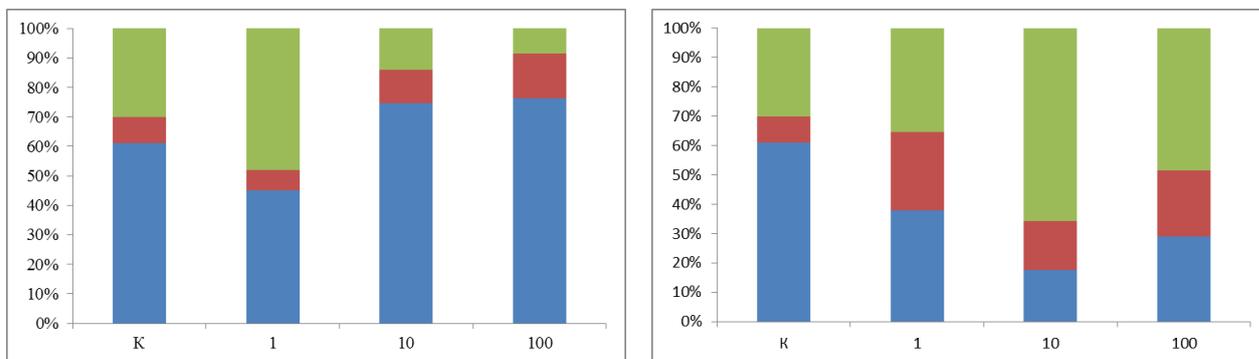


Рис. 1. Распределение субпопуляций клеток целомической жидкости (снизу-верх: гранулоциты, мелкие клетки, агранулоциты) для свинца и железа, соответственно.

Эти две группы можно сопоставить с группами металлов, которые интенсивно выводятся из организма (медь, свинец, кадмий) и группой биогенных металлов (способных к накоплению, марганец, железо, кобальт). Металл, поступая в организм, связывается с белками (лигандами) целомической жидкости. Так, увеличение доли агранулоцитов может свидетельствовать об интенсивных процессах фагоцитоза агрегатов металл-лиганд и дальнейшем их выведении, а увеличение доли гранулоцитов об интенсивном синтезе белков способных связывать металлы [Темара и др., 1996].

Данные измерений концентраций металлов в теле морских проанализированы регрессионным анализом, результаты которого приведены в табл. 2.

Табл. 2. Уравнения линейной регрессии для металлов, где y – концентрация металла в морских звездах, x – концентрация в воде аквариума.

Металл	Уравнение линейной регрессии	R^2
Медь	$y = 0.2365x + 0.9281$	0.78
Железо	$y = 0.0013x + 36.761$	0.14
Кадмий	$y = 0.01x + 3.5741$	0.99
Свинец	$y = 0.1251x + 8.6007$	0.99
Кобальт	$y = 0.0084x + 0.1876$	0.99
Марганец	$y = 0.0344x + 1.9166$	0.86

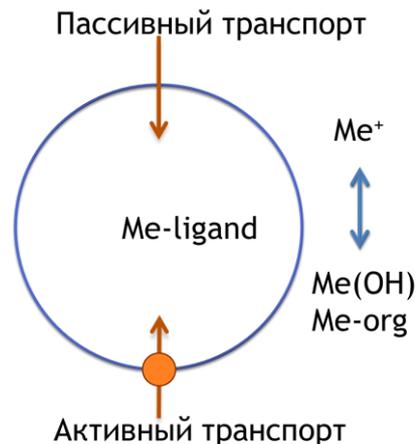


Рис. 2. Общая схема поступления металлов в целомоциты иглокожих [Темара и др., 1996].

На основе значений коэффициента при x можно построить ряд по уменьшения способности металлов накапливаться в теле морских звезд: $Pb > Cu > Fe > Mn > Cd > Co$.

Физико-химические характеристики ионов металлов влияют на их способность накапливаться в организмах. Ковалентный индекс ($\chi^2_{m\Gamma}$) обуславливает связь с «мягкими» лигандами, серосодержащими аминокислотами. Константа гидролиза (K_{OH}) обуславливает связь со «средними» лигандами, с группами донорами кислорода. Ионный индекс (Z^2/r) обуславливает способность металлов образовывать нерастворимые комплексы в водной среде. Для пресноводных организмов наибольший вклад в биоконцентрацию тяжелых металлов имеет ковалентный индекс [Kolck van и др., 2008].

Наибольшее значение коэффициента детерминации ($R^2=0.56$, $p=0.03$) характерно для ионного индекса, что может свидетельствовать о первостепенной роли комплексообразования ионов металлов с компонентами морской воды, нежели их связывание с белками организма.

Заклучение

В ходе работы показана высокая способность к адаптации морских звезд на уровне клеток целомической жидкости, проявляемая в отсутствии различий между численностью клеток в экспериментальных аквариумах, с высоким содержанием металлов, и контрольной группой. Медь является наиболее токсичным металлом, высокие концентрации которой приводят к гибели морских звезд *Asterias rubens*. По влиянию на распределение клеточных субпопуляций, металлы можно разделить на две группы – накапливающиеся в организме, для которых характерно увеличение доли гранулоцитов и не накапливаемые, для которых характерно увеличение доли агранулоцитов. Способность к биоконцентрации уменьшается в ряду Pb>Cu>Fe>Mn>Cd>Co. Биоконцентрацию в большей степени обуславливает способность металлов образовывать нерастворимые комплексы в морской воде.

Список источников:

1. Coteur G. и др. Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment-Associated Metals and PCBs in the North Sea // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2003. Т. 45. № 2. С. 190–202.
2. Kolck M. van и др. Estimating bioconcentration factors, lethal concentrations and critical body residues of metals in the mollusks *Perna viridis* and *Mytilus edulis* using ion characteristics. // Environ. Toxicol. Chem. 2008. Т. 27. № 2. С. 272–276.
3. Temara A. и др. Allometric Variations in Heavy Metal Bioconcentration in the Asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1996. Т. 56. № 1. С. 98–105.
4. Козлова А., Петухова О., Пинаев Г. Анализ клеточных элементов целомической жидкости на ранних сроках регенерации морской звезды *ASTERIAS RUBENS* L. // Цитология. 2006. Т. 48. № 3. С. 175–183.
5. Патин С.А. Эколого-токсикологические подходы к оценке воздействия на морскую среду и биоресурсы // Актуальные проблемы водной токсикологии. , 2004. С. 248.

TOXICITY AND BIOCONCENTRATION OF HEAVY METALS IN SEA STARS ASTERIAS RUBENS: MECHANISTIC APPROACH AND MODELING

V.A. Fedyunin, A.A. Poromov

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

e-mail: aap1309@gmail.com

During the toxicological experiments with heavy metals changes at the level of cells of the coelomic fluid of starfish *Asterias rubens* were described, at the end of the experiment the content of heavy metals in the bodies of the starfish was determined. It is shown that copper is the most toxic metal. The value of coelomocytes of various subpopulations is defined by the way of adaptation of starfish to a particular metal (metal accumulation in the body or its elimination). The ability to bioconcentrate decreases in the order Pb>Cu>Fe>Mn>Cd>Co.

Keywords: starfish, *Asterias rubens*, coelomocytes, heavy metal toxicity, bioconcentration