

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Федюнин Владимир Александрович

**ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ НА МОРСКИХ ЗВЕЗД *ASTERIAS RUBENS***

Специальность 03.02.08 – Экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре общей экологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель: **Смуров Андрей Валерьевич**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Терехова Вера Александровна**
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры земельных ресурсов и оценки почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Бритаев Темир Аланович
доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией морфологии и экологии морских беспозвоночных ФГБУН институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Мокиевский Вадим Олегович
доктор биологических наук, руководитель лаборатории прибрежных донных сообществ ФГБУН Институт океанологии имени П.П. Ширшова РАН

Защита диссертации состоится 22 декабря 2020 г. в 15 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.03.05 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, ГСП–1, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ, факультет почвоведения, ауд. М-2.

Эл. почта: mmakarov@soil.msu.ru

Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/249190018/>.

Автореферат разослан «19» ноября 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ковалева Наталия Олеговна



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Несмотря на то, что к настоящему моменту в рамках разработки оптимальных методик оценки уровня загрязненности морских вод проведено множество исследований, методы репрезентативной оценки качества морских вод все еще нуждаются в более глубоком осмыслении, так как многие из них основаны на показателях, используемых для пресноводных рыбохозяйственных водоемов, но не учитывают физические и химические особенности морской воды. В большой степени это относится к методам биоиндикации и биотестирования, широко используемым как для установления экологических нормативов, так и для интегральной оценки качества морских вод.

Разработан ряд эколого-токсикологических методик (OECD, ISO, EPA Guidelines), использующих различные виды беспозвоночных и их биологические показатели для оценки состояния окружающей среды. Однако эти методы ограничены использованием относительно небольшого числа видов и базовыми биологическими характеристиками (выживаемость, плодовитость, скорость роста). Именно поэтому основные тенденции в области экологической токсикологии в настоящий момент связаны с поиском и изучением наиболее релевантных видов беспозвоночных животных, а также с использованием новых экспериментальных методов, критериев и подходов к экстраполяции результатов. Эти методы должны учитывать воздействия различных факторов на нескольких уровнях биологической организации с использованием молекулярных, физиологических, поведенческих, демографических и других конечных точек. При этом, ключевым этапом в эколого-токсикологических исследованиях остается определение летальных и сублетальных концентраций веществ.

Несмотря на большой объем информации, описывающей влияние токсических веществ и, в частности, соединений тяжелых металлов на морских беспозвоночных, действие этих веществ на представителей типа Echinodermata до сих пор остается малоизученным, тогда как именно представители данного типа являются исключительно морскими обитателями, не встречающимися в пресных водах. Так, не установлены летальные и сублетальные концентрации металлов для морских звезд *Asterias rubens* в морской воде [Ecotoxuserguide, 2018]. Такие данные, с одной стороны, являются важной составляющей системы оценки экологического риска [Stark, 2005] и, с другой стороны, необходимы для качественного планирования экспериментов, направленных на установление конкретных механизмов действия токсических веществ. Также малоизвестно, в каких концентрациях соединения металлов могут представлять опасность и вызывать функциональные изменения, не приводя к немедленной гибели организма.

Морские звезды *Asterias rubens* (Linnaeus, 1758), обитающие на мелководьях северной части Атлантического океана (от Каролины на западе до Сенегала на востоке), являются типичными бентосными организмами Северного, Белого и западной части Балтийского морей. Их высокая экологическая пластичность обеспечивает широкое распространение и устойчивость к антропогенному воздействию, а также обуславливает возможность их использования в качестве модельных организмов на большой территории и в условия высоких уровней антропогенной нагрузки.

По результатам предварительных экспериментов и на основе исследований других авторов отмечено, что воздействие ксенобиотиков приводит к увеличению числа циркулирующих целомоцитов [Coteur, 2003; Lindberg, 2012]. При этом закономерности изменения клеточного состава циркулирующих целомоцитов в ответ на воздействие различных концентраций металлов до сих пор исследованы не были.

Для изучения реакций организма морских звезд *Asterias rubens* на повышение концентрации металлов в морской воде в настоящей работе представлена серия экспериментов, направленных на оценку воздействия ионов кобальта, марганца, железа, свинца, кадмия и меди на морских звезд *Asterias rubens* в лабораторных условиях. Оценивали выживаемость и изменение поведенческих реакций животных, был проведен морфофункциональный анализ клеток целомиической жидкости. Для изучения особенностей клеточного ответа морских звезд на воздействие металлами оценено изменение числа циркулирующих в целомиической жидкости клеток, а также распределение клеток по различным клеточным субпопуляциям. Оценена жизнеспособность клеток, а также синтез специфических маркеров стресса при воздействии на морских звезд различными концентрациями меди. Полученные данные соотнесены с экспериментальными концентрациями металлов в воде и биоконцентрацией металлов в телах морских звезд.

Цель настоящей работы: описать и изучить токсические эффекты ионов тяжелых металлов на морских звезд *Asterias rubens* на организменном, клеточном и молекулярном уровнях для расширения подходов к оценке экологического риска загрязнения морской среды.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние ионов металлов (свинец, кадмий, марганец, медь, железо, кобальт) на выживаемость морских звезд *Asterias rubens*;
2. Исследовать поведенческий ответ морских звезд *Asterias rubens* при воздействии ионов металлов (свинец, кадмий, марганец, медь, железо, кобальт);

3. Исследовать влияние ионов металлов (свинец, кадмий, марганец, медь, железо, кобальт) на общее число циркулирующих в целомической жидкости клеток, а также на изменение числа клеток в различных клеточных субпопуляциях у морских звезд *Asterias rubens*;
4. Исследовать влияние ионов меди на функциональную активность целомоцитов и синтез специфических маркеров стресса в клетках целомической жидкости морских звезд *Asterias rubens*;
5. Сравнить действующие экологические нормативы с концентрациями, вызывающими токсические эффекты у морских звезд *Asterias rubens*.

Научная новизна работы. Научная новизна работы заключается в исследовании комплексного ответа (от молекулярного до организменного уровня организации) иглокожих на примере морской звезды *Asterias rubens* при воздействии тяжелых металлов – одних из наиболее распространенных загрязнителей морской среды – в условиях эксперимента. Проведено молекулярно-биологическое исследование механизмов реализации токсических эффектов при воздействии ионов тяжелых металлов (меди, кадмия, свинца, железа, марганца и кобальта) у морских звезд *Asterias rubens*. Для исследованных металлов впервые проведено сравнение концентраций, установленных действующими нормативами, с реальными концентрациями, оказывающими токсический эффект на морских звезд *Asterias rubens*.

Практическая значимость работы. Результаты исследования позволят дополнить существующие данные о токсикологии тяжелых металлов в условиях морской среды, необходимые для адекватной оценки экологического риска. Морские звезды *Asterias rubens* могут быть использованы как тест-объекты для оценки состояния морской среды. Комплексный подход, использующий методы одновременного установления развития токсического эффекта на различных уровнях биологической организации свидетельствует о потенциальной ценности поведенческих и клеточных методов оценки при определении токсичности химических веществ для морских организмов, а также указывает на возможность использования иглокожих в экологических исследованиях. Токсические эффекты ионов металлов на молекулярном и клеточном уровнях организации морских звезд *Asterias rubens* могут быть использованы для раннего выявления последующих нарушений на организменном уровне.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее токсичными для морских звезд *Asterias rubens* являются ионы меди. Далее токсичность убывает в ряду $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ по всем исследуемым показателям.

2. При увеличении концентрации исследованных металлов наблюдается увеличение числа клеток в целомической жидкости. Число клеток целомической жидкости достоверно свидетельствует о возможных последующих токсических эффектах на организменном уровне.
3. Токсические эффекты, выявляемые на молекулярном уровне организации морских звезд *Asterias rubens* при воздействии ионов меди в относительно небольших концентрациях, при дальнейшем их увеличении приводят к токсическим эффектам на более высоких уровнях организации (клеточном, организменном).
4. Действующие экологические нормативы, установленные для рыбохозяйственных водоемов, для ионов меди, свинца, кадмия, железа, кобальта и марганца значительно ниже концентраций, вызывающих токсические эффекты у морских звезд *Asterias rubens*.
5. Морские звезды *Asterias rubens* могут быть использованы в качестве модельного тест-объекта и биоиндикатора при оценке загрязнения морской среды.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены на 5 конференциях: XI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием для молодых учёных по проблемам водных экосистем «Понт Эвксинский – 2019» (Севастополь, Россия, 23–27 сентября 2019); Международная конференция SETAC Europe 27th Annual Meeting, (Брюссель, Бельгия, 7-11 мая 2017); Конференция «Морские биологические исследования: достижения и перспективы» (Севастополь, Россия, 19-24 сентября 2016); Международный симпозиум «Biodiagnostics and assessment of environmental quality: approaches, methods, criteria and reference standards in ecotoxicology (Москва, Россия, 25-28 октября 2016); 13-ая Всероссийская конференция с международным участием "Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем" (Киров, Россия, 1-2 декабря 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в списки *Scopus* и *RSCI WoS*.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана на 101 страницах компьютерного текста, включает в себя введение, три главы, заключение и выводы. Работа включает 10 рисунков, 6 таблиц, 160 литературных источников и 1 Приложение, включающее описание статистического анализа данных.

Благодарности. Автор выражает глубокую искреннюю благодарность своему научному руководителю, профессору кафедры общей экологии и гидробиологии, Андрею Валерьевичу Смурову и научному сотруднику кафедры

общей экологии Артёму Андреевичу Поромову за всестороннюю поддержку в ходе проведения исследования, ценные советы и рекомендации, полученные при планировании экспериментальных работ и обсуждении результатов. Коллективу кафедры общей экологии биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова за активную дискуссию и важные замечания, полученные в процессе обсуждения промежуточных результатов работы. Коллективу Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова за помощь в организации исследований. Коллективу лаборатории эколого-токсикологических исследований ФГБУН ВНИРО за помощь в проведении экспериментальных работ. Аспирантам и сотрудникам институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН за помощь в проведении экспериментальных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы описаны современные подходы к оценке загрязнения морской среды, даны характеристики биоиндикации и биотестирования, критерии биоиндикации. Приведено описание *in vitro* подходов к оценке состояния морской среды. Приведена общая характеристика объекта исследования – морских звезд *Asterias rubens* как целевого объекта для оценки состояния морской среды, с точки зрения требований, выдвигаемых современной системой биоиндикации к тест-организмам. Описан клеточный состав целомической жидкости и функции различных субпопуляций клеток морских звезд *Asterias rubens*. Дана краткая характеристика влияния некоторых металлов на морских звезд *Asterias rubens* как в естественных условиях, так и в экспериментах, проводимых в лаборатории. Описаны особенности стресс-индуцируемых белков в контексте оценки изменения их экспрессии у морских беспозвоночных в условиях загрязнения среды их обитания.

Глава 2. Материалы и методы

Морских звезд *Asterias rubens* собирали в районе Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова (ББС МГУ). Сбору подлежали только неповрежденные пятилучевые морские звезды диаметром 10-12 см. Морских звезд содержали в стеклянных аквариумах объемом 20 литров, температура воды составляла $15 \pm 2^\circ\text{C}$, соленость воды – 26‰, естественный световой цикл.

Концентрации металлов в экспериментальных аквариумах, использованные в ходе работы, приведены в табл. 1. Концентрации рассчитаны относительно единиц ПДК (предельно допустимые концентрации), установленных для металлов в водах рыбохозяйственных водоемов [под ред. Коршенко, 2015] и подобраны на

основе предварительно проведенных экспериментов [Федюнин и др., 2018]. Концентрации выражены в единицах мкМ в связи с тем, что данная единица измерения является наиболее часто используемой в релевантной научной литературе. Поведенческую реакцию морских звезд *Asterias rubens* оценивали на 4-ые сутки эксперимента по изменению скорости переворота животных с аборальной стороны на оральную. Выживаемость оценивали ежедневно до 7-ых суток, включительно. Гибель морских звезд фиксировали по невозможности перевернуться и отсутствию движения амбулакральных ножек. Для каждой концентрации экспозицию проводили в трех экспериментальных аквариумах, в каждом из которых содержали по 10 морских звезд ($n = 30$).

Таблица 1. Содержание металлов в районе исследования, ПДК, концентрации металлов в экспериментальных аквариумах

Содержание металлов в районе исследования и ПДК						
Концентрации	Cu^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{3+}	Co^{2+}
Средняя концентрация металлов в Кандалакшском заливе, мкМ [под ред. Коршенко, 2015]	0,086	0,007	0,002	0,112	0,482	-
Среднее содержание элементов в гидросфере (кларк), мкМ (мировой океан) [Соловов, 1990]	0,0039	0,0001	0,0006	0,0018	0,0893	0,0051
Предельно допустимая концентрация, мкМ [Приказ от 18 января 2010 года № 20, Москва]	0,078	0,048	0,089	0,909	0,893	0,085
Концентрации металлов в экспериментальных аквариумах, мкМ						
Концентрации	Cu^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{3+}	Co^{2+}
1*	0,078	-	-	-	-	-

10	0,78	-	0,89	-	8,93	-
25	1,95	-	2,23	-	-	-
50	3,91	-	4,46	-	44,64	-
75	5,86	-	-	-	-	-
100	7,81	-	8,93	-	89,29	-
150	-	7,245	13,38	-	-	-
200	15,62	9,66	17,86	-	178	-
250	-	12,07	-	-	-	-
275	-	13,28	-	-	-	-
300	-	14,49	-	-	-	-
400	-	-	-	363,6	357,1	33,9
800	-	-	-	727,2	714,2	67,8
1200	-	-	-	1090	-	101,7
2000	-	-	-	1818	-	169,5
3000	-	-	-	2727	-	-
4000	-	-	-	3636	-	339
6000	-	-	-	-	-	508,5
10000	-	-	-	-	-	847,5
12000	-	-	-	-	-	1017
15000	-	-	-	-	-	1271

* – превышение ПДК, раз, «-» – данные отсутствуют

Время, необходимое животному для полного переворота с аборальной стороны на оральную называется временем переворота (righting time, RT). Этот показатель можно использовать для оценки общего состояния организма некоторых иглокожих [Canty, 2009]. В рамках данного исследования время переворота измеряли в отдельном стеклянном контейнере (размером 30 см × 30 см × 24 см), наполненном 15 литрами чистой морской воды. Каждую морскую звезду переворачивали и помещали в центр контейнера так, чтобы ни один из её лучей не касался краев контейнера. Измерения проводили для 6 морских звезд *Asterias rubens* из каждого экспериментального и контрольного аквариумов.

Для проведения анализа изменения числа циркулирующих целоμοцитов в ответ на воздействие металлов 0,6 мл целомической жидкости экстрагировали из полости тела морских звезд, используя шприц объемом 1 мл. Далее собранную целомическую жидкость помещали в микропробирки объемом 1,5 мл, содержащие равный объем 28 мМ раствора ЭГТА для предотвращения коагуляции клеток.

Целомическую жидкость экстрагировали из пяти морских звезд в каждом аквариуме трижды в ходе исследования – на 1 (24 ч.), 4 (96 ч.), и 7 (168 ч.) сутки эксперимента. Общую численность клеток в целомической жидкости подсчитывали под микроскопом с помощью камеры Горяева в двух повторностях с предварительным окрашиванием клеток 0,6% раствора красителя толуидинового синего. Для проведения анализа клеточного состава целомической жидкости клетки окрашивали методом Романовского-Гимзы [Venier, Maron, Canova, 1997]. Процентное соотношение различных клеток оценивали на 1 (24 ч), 3 (72 ч) и 7 (168 ч) сутки эксперимента. В каждой пробе подсчитывали 500 клеток целомической жидкости, оценивали три типа клеток: амебоциты, гранулоциты и мелкие клетки.

Исследование жизнеспособности выделенных целомоцитов морских звезд *Asterias rubens* проводили с помощью цитотоксического теста с использованием красителя нейтрального красного (НК) [Borenfreund, 1984; Hauton, 2004]. В качестве стимуляторов использовали растворы хлорида меди ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) с концентрацией ионов меди равной 0,78 мкМ, 1,95 мкМ и 3,91 мкМ. Спектроскопию проводили на многоканальном спектрофотометре BioRad X-mark (BioRad, США) при $\lambda=570$ нм. Результат выражали в единицах ОП на 3×10^5 целомоцитов. Оценку жизнеспособности производили по формуле:
$$\text{жизнеспособность (\%)} = 100\% \times \frac{\text{оптическая плотность экспериментальная}}{\text{оптическая плотность в контроле}}.$$

Анализ уровня экспрессии белка HSC70 в условиях воздействия медью проводили методом иммуноблоттинга по методике Towbin [Towbin et al., 1979] с модификациями. В качестве первичных антител использовали коммерчески доступные бычьи моноклональные антитела к белкам теплового шока 70 кДа (hsp70 McAb) (Sigma Chemical Company, H-5147, St Louis, MO, USA) в разведении 1:5000. Это антитело распознает как индуцибельные (HSP70), так и конститутивные (HSC70) изоформы белка теплового шока. В качестве вторичных антител использовали коммерческие антитела anti-mouse IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Amersham, Великобритания), в разведении 1:10000. Результаты были представлены в виде произвольных единиц, полученных в результате объемного анализа полос.

Определение концентрации металлов производили во всем теле морских звезд *Asterias rubens*, без сегрегации на органы. Измерения отвечали методике ФР 1.31.2009.06787 (Выполнение измерений массовой доли элементов в твердых объектах с помощью масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой)

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета RStudio (версия 1.0.143). Для количественных показателей результат представлен в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD), для графического

представления использована стандартная ошибка (SE). Для оценки влияния различных концентраций металлов на исследуемые показатели использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для межгрупповых сравнений количественных показателей использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок и его непараметрический аналог – U-критерий Манна-Уитни. Для множественных сравнений использовался тест Тьюки. При использовании статистических процедур различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Для оценки выживаемости использовали четырехпараметрическую логистическую регрессионную модель (пакет «drc»), на основе которой рассчитаны полулетальные концентрации (ЛК50) после 4-х суток экспозиции. 96-часовая (4 суток) продолжительность выбрана как наиболее широко используемая временная точка в стандартных токсикологических экспериментах, принятых в методиках ISO и OECD.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Анализ выживаемости морских звезд в условиях воздействия металлами

Проведено сравнительное исследование выживаемости морских звезд *Asterias rubens* в условиях воздействия тяжелыми металлами в течение 7 суток. Результаты эксперимента позволили ранжировать металлы от наиболее токсичного к наименее. Наиболее токсичным в ряду исследованных металлов оказалась медь. МПК для Cu^{2+} составила 0.078 мкМ. Гибель первых экспериментальных животных в экспериментах с медью наблюдали уже при концентрациях ионов равной 0,78 мкМ. Полностью экспериментальная группа животных погибала на четвертые сутки эксперимента при концентрации 3,9 мкМ. МПК Pb^{2+} составила 0.48 мкМ, Pb^{2+} в концентрациях от 0,48 до 9,66 мкМ приводил к снижению выживаемости от 60 до 100% в течение 7 суток эксперимента, 100% гибель морских звезд отмечалась при концентрации Pb^{2+} больше 9,66 мкМ. Сходные результаты получены для Cd^{2+} , но стопроцентная гибель животных в пробах с этим металлом не наблюдали. Для Cd^{2+} МПК составила 4,46 мкМ, гибель на 7 сутки при 8,93 и 17,86 мкМ составила 10 и 90%, соответственно. Для Mn^{2+} и Co^{2+} токсичными становились концентрации, в значительной мере превышающие предельно допустимые, проявление токсических эффектов с этими металлами занимало больше времени, чем в случае воздействия Cu^{2+} , Pb^{2+} и Cd^{2+} . Гибель *Asterias rubens* при воздействии любых концентраций Fe^{3+} не наблюдалась. В аквариуме с содержанием Fe^{2+} 700 мкМ начинало наблюдаться выпадение осадка. По этой причине более высокие

концентрации железа исследованы не были. МПК Co^{2+} , Fe^{3+} и Mn^{2+} составили 16,95, 178 и 182 мкМ, соответственно.

Полулетальные концентрации (ЛК_{50}) вычислены с использованием четырехпараметрической логистической модели, которая представлена на рис. 1, на четвёртые сутки экспозиции (96 часов). По значению ЛК_{50} все использованные в ходе эксперимента металлы ранжируются по снижению токсичности в следующем порядке: Cu^{2+} ($\text{ЛК}_{50} = 0,98 \pm 0,16$ мкМ), Pb^{2+} ($\text{ЛК}_{50} = 9,6 \pm 0,4$ мкМ), Cd^{2+} ($\text{ЛК}_{50} = 15,1 \pm 0,96$ мкМ), Co^{2+} ($\text{ЛК}_{50} = 979 \pm 35,9$ мкМ), Mn^{2+} ($\text{ЛК}_{50} = 1449 \pm 78,4$ мкМ).

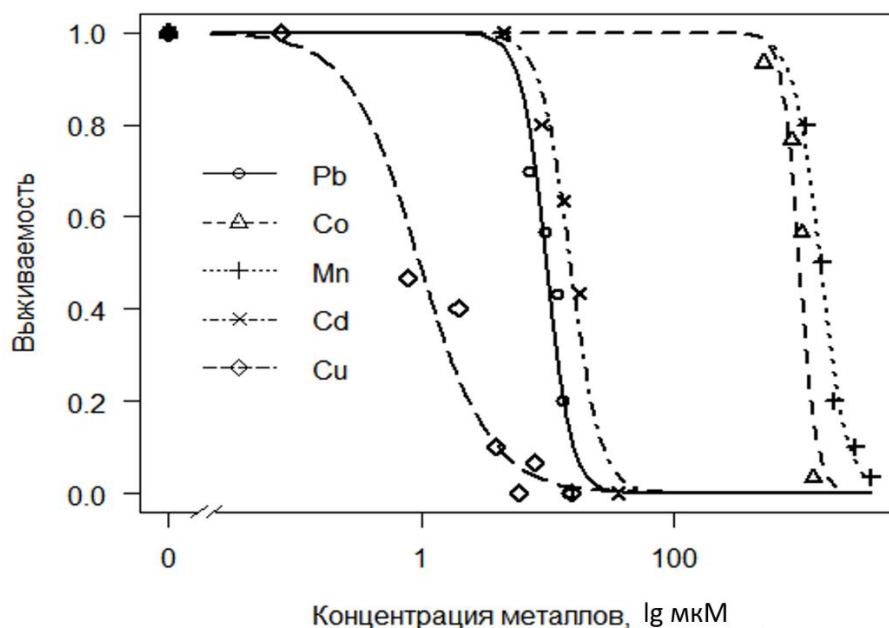


Рисунок 1. Влияние металлов на выживаемость (4-х параметрическая логистическая модель) морских звезд *Asterias rubens* через 96 часов после начала экспозиции.

3.2 Поведенческий ответ (время переворота, RT)

Время, необходимое морской звезде для совершения переворота, увеличивается при наличии в воде всех исследуемых металлов. Наиболее резко время переворота увеличивается при воздействии растворами Cu^{2+} и Pb^{2+} на четвёртые сутки эксперимента. Cu^{2+} значительно увеличивает время переворота (вдвое, полуэффективная концентрация, ЭК_{50}) при концентрации $1,88 \pm 4,1$ мкМ, ионы Pb^{2+} вызывают тот же эффект при концентрации $9,5 \pm 1,12$ мкМ. Действие Cd^{2+} в концентрации более 0,89 мкМ ведёт к статистически значимому увеличению времени переворота ($\text{ЭК}_{50} = 1,96 \pm 4,21$ мкМ), и, в отличие от прочих металлов, последующее увеличение времени переворота не отмечается, при концентрациях Cd^{2+} вплоть до концентраций, приводящих к гибели особей. Увеличение концентрации Fe^{3+} , Co^{2+} и Mn^{2+} ведёт к статистически значимому

увеличению времени переворота *Asterias rubens* при повышенных концентрациях. ЭК₅₀ для этих металлов не рассчитывали, так как зависимость между скоростью переворота и концентрацией металлов хоть и носила доза-зависимый характер, но не соответствовала ни одной используемой для аппроксимации полученных данных модели ($R < 0.6$).

(А)

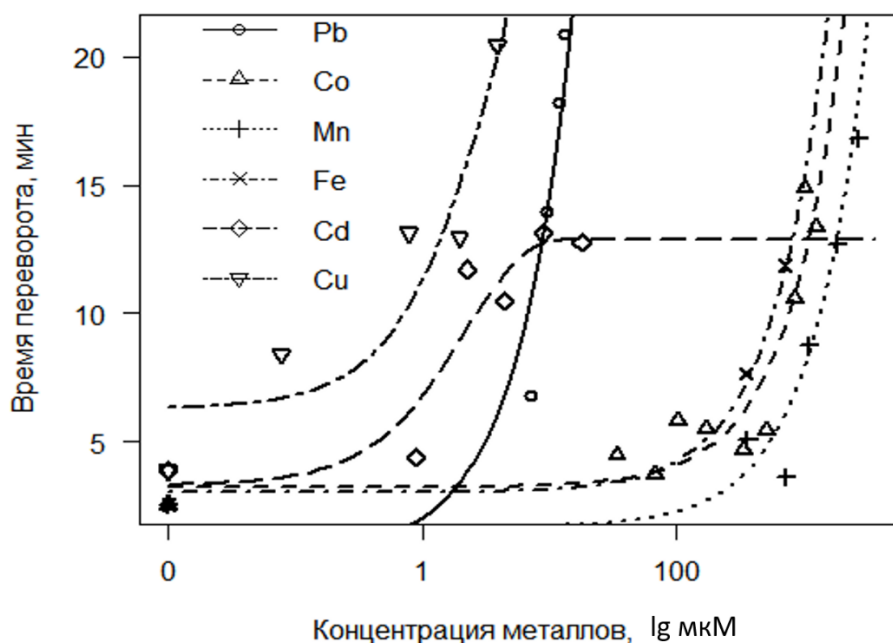
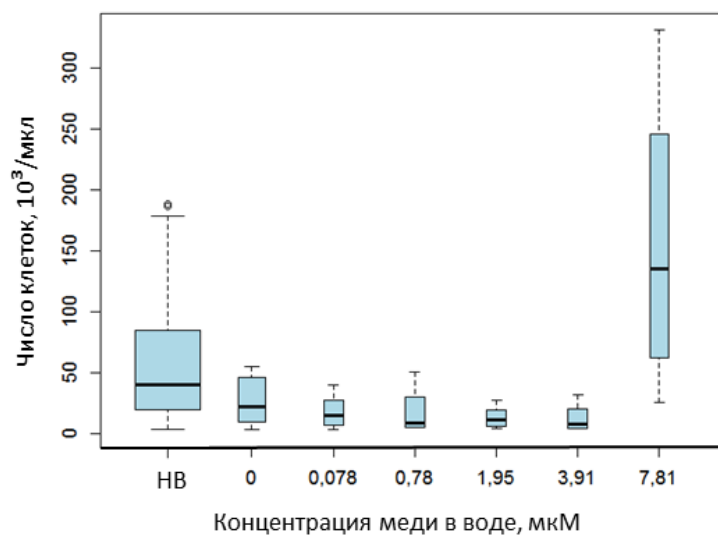


Рисунок 2. Влияние металлов на скорость переворота (3-х параметрическая экспоненциальная модель) морских звезд *Asterias rubens* через 96 часов после начала экспозиции.

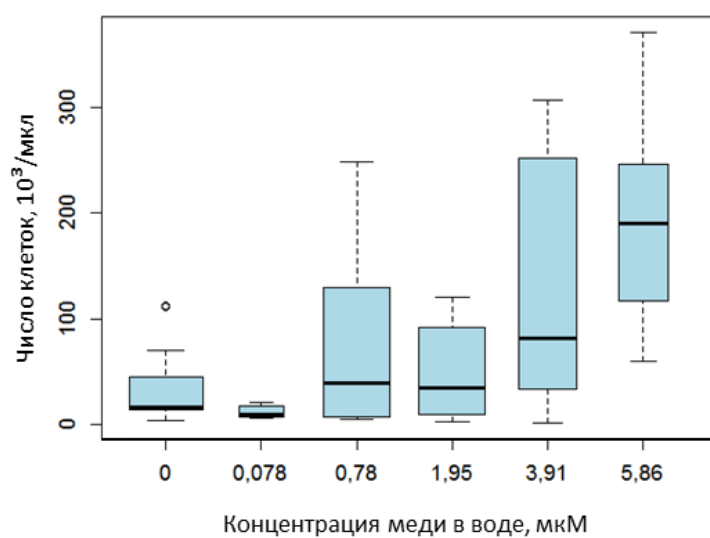
3.3 Изменение числа циркулирующих целомоцитов *Asterias rubens* в ответ на воздействие металлов

Число клеток в целомической жидкости в начале эксперимента составило $(52,7 \pm 43,7) \times 10^3 / \text{мкл}$ (медиана $37,7 \times 10^3 / \text{мкл}$). После 5 дней воздействия наблюдалось незначительное снижение среднего числа клеток у морских звезд в экспериментальном аквариуме $(35,2 \pm 9,6) \times 10^3 / \text{мкл}$. Значительное различие в числе клеток наблюдали между отдельными звездами, без статистически значимых различий между группами. После трёх и пяти дней от начала эксперимента среднее число клеток целомической жидкости у животных во всех экспериментальных аквариумах было существенно больше, чем у контрольных ($p < 0,05$). На третьи сутки проведения эксперимента статистически значимое повышение числа целомоцитов отмечалось при введении максимальных концентраций Pb^{2+} , Cu^{2+} и Cd^{2+} , после чего наблюдали рост смертности в группах через пять суток от начала эксперимента. Наибольшее число концентраций было исследовано для меди как наиболее токсичного металла (Рис. 3).

А.



Б.



В.

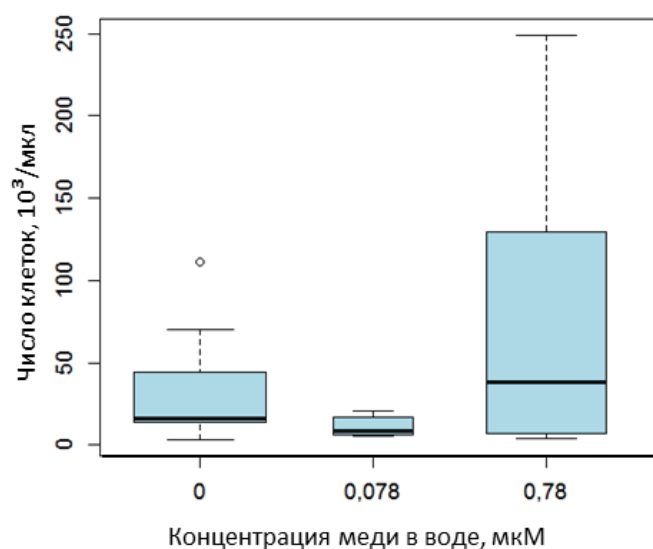


Рисунок 3. Клеточный ответ *Asterias rubens* в условиях воздействия меди. НВ – начало воздействия. А – Начало воздействия (НВ) и 1 день эксперимента, Б – 3 день эксперимента, В – 5 день эксперимента.

Число клеток в целомической жидкости увеличивалось после воздействия высокими концентрациями меди уже через 1 день и через 3 дня воздействия кадмием, свинцом, железом, кобальтом и марганцем. Целомоциты представляют собой неоднородную группу клеток, однако, среди них можно выделить два основных типа: агранулоциты и гранулоциты [Tahseen, 2009]. Увеличение числа гранулоцитов можно связать с реализацией процессов детоксикации: они могут выступать в роли барьера, препятствующего распространению металла по органам морской звезды. Известны пути выведения металлов и других токсикантов из тел иглокожих через осевой орган и папулы [Cobb, 1978; Bachmann, 1980]. Таким образом, увеличение числа циркулирующих в целомической жидкости клеток можно связать с активацией защитных реакций клеточного иммунитета, который реализуется посредством целомоцитов, являющихся аналогами иммунных клеток позвоночных, захватывающих, инактивирующих и выводящих из организма вещества-ксенобиотики.

3.4 Анализ клеточного состава целомической жидкости

На основе микроскопического исследования состава целомической жидкости были выделены следующие морфотипы клеток: агранулоциты (они же – фагоцитарные амебоциты), гранулоциты (они же – красные сферические клетки, красные амёбоциты), а также мелкие клетки.

Распределение клеток по морфотипам (клеточным субпопуляциям) у морских звезд *Asterias rubens*, не подверженных воздействию ионов металлов, соответствовало данным Козловой и др. (2006): агранулоциты были самой многочисленной группой клеток в целомической жидкости, тогда как число мелких клеток было наименьшим (Рис. 4).

Базируясь на результатах собственных экспериментов и данных литературы, металлы, которые применялись в экспериментах, можно разделить на две группы: доля агранулоцитов увеличивалась после воздействия Cu^{2+} , Pb^{2+} и Cd^{2+} , тогда как доля гранулоцитов увеличивалась после воздействия Mn^{2+} , Fe^{3+} и Co^{2+} . Разница в среднем проценте гранулоцитов между группами была статистически значима (критерий Тьюки, $p < 0,05$). Число мелких клеток увеличивалось при воздействии всеми исследованными металлами.

Увеличение доли гранулоцитов (красных амебоцитов) в ответ на воздействие ионов металлов может быть связано с быстрым делением клеток целомического эпителия, который присутствует у всех иглокожих и описан ранее для морских звезд *Asterias rubens* [Pinsino, Della Torre, et. al., 2008] и *Antedon mediterranea* [Candia Carnevali, Bonasoro et. al., 1995]. В цитоплазме красных амебоцитов содержатся хорошо различимые гранулы [Branco, Figueiredo 2014],

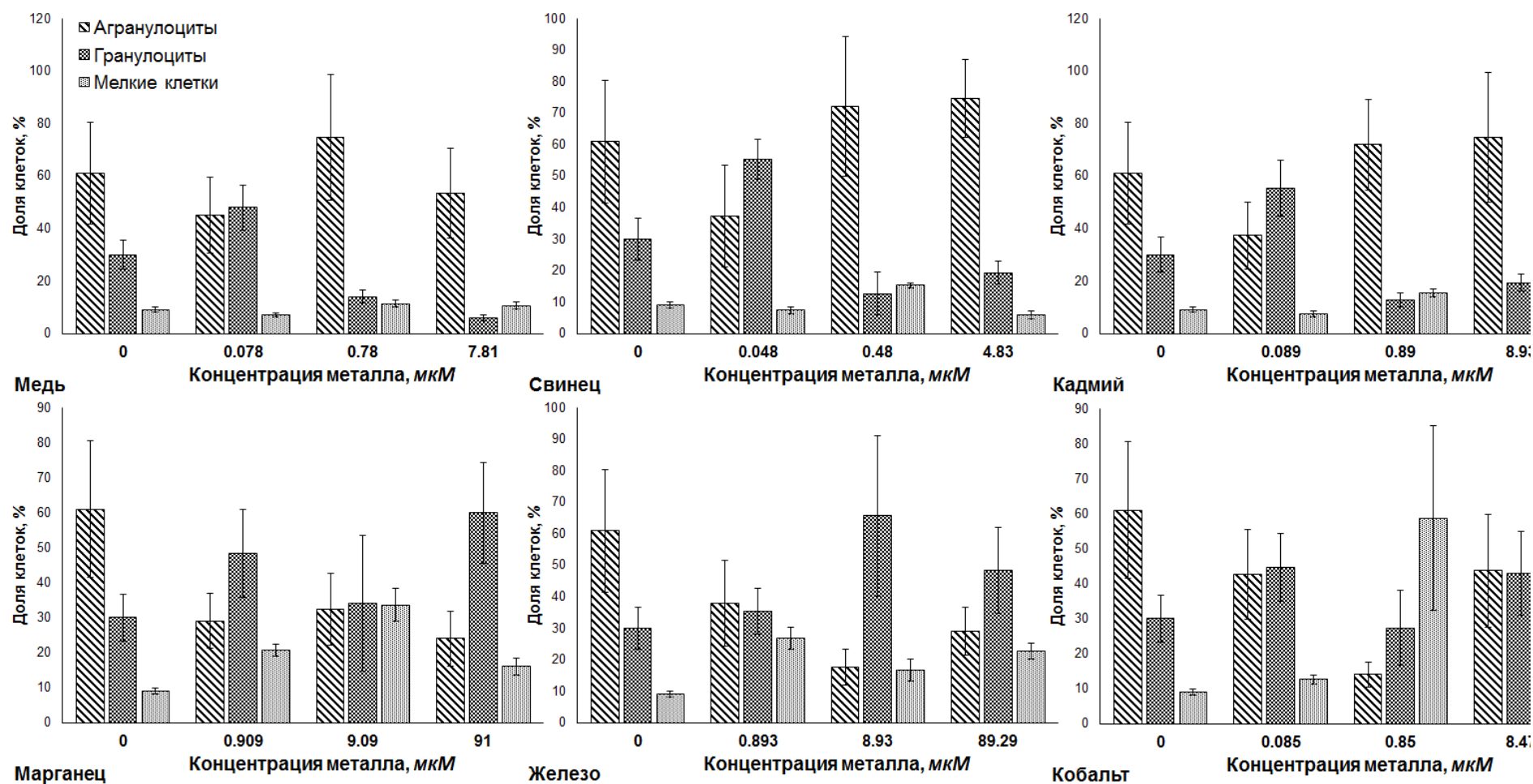


Рисунок 4. Изменение в соотношении клеток в субпопуляциях целомоцитов *Asterias rubens* (агранулоциты, гранулоциты, мелкие клетки) в процентах после 5 дней воздействия металлами

которые могут выступать в роли пула лигандов для некоторых металлов и, возможно, могут принимать участие в связывании и выведении этих металлов из организма [Soto et. al., 2013]. Увеличение числа агранулоцитов может быть связано как с повышением уровня фагоцитоза, так и с участием в транспортировке металлов между тканями и к органам выведения. Массовая миграция гемоцитов (клеток целомической жидкости беспозвоночных) в папулы, пищеварительный тракт и другие органы детоксикации в условиях воздействия металлами (Cd, Cu, Pb) была ранее показана в экспериментах с моллюсками. Известно о возможности выведения кадмия и меди у моллюсков путем их связывания со специфическими белками, называемыми металлотионеинами, а также о путях выведения металлов путем включения в лизосомы фагоцитов [Soto et. al., 2013].

В данной работе подтверждено увеличение числа мелких клеток при воздействии всеми исследуемыми металлами, что ранее показано другими авторами [Козлова и др., 2006], и может представлять собой, с одной стороны, общий ответ организма на стресс и, с другой стороны, служить источником новых клеток.

Основываясь на различии в ответе клеточных элементов *Asterias rubens* на воздействие ионами исследованных металлов, а также приведенных ранее литературных данных о функциональных особенностях различных групп клеток, использованные в данной работе металлы можно разделить на менее и более токсичные, а клеточный состав целомической жидкости использовать как показатель характера загрязнения окружающей среды.

3.5 Оценка поглощение нейтрального красного целомоцитами морской звезды *Asterias rubens*

В сравнительно-иммунологических экспериментах оценка непроизвольного и индуцированного поглощения красителя нейтральный красный (НК) используется для изучения способности клеток к пиноцитозу и макропиноцитозу, а также в целях исследования жизнеспособности клеток *in vitro*. Стимулятором послужил раствор хлорида меди ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) с концентрацией Cu^{2+} от 0 мкМ, через значения 0,78 мкМ, и 1,95 мкМ до 3,91 мкМ (фракции 1, 2, 3 и 4). Исследования показали, что спустя шесть часов эксперимента, отложение НК в лизосомах и цитоплазме интактных целомоцитов статистически значимо увеличивалось от фракции № 1 к фракции № 3, а после этого резко уменьшалось (фракции № 4) (рис. 5). При этом статистически значимые различия отмечались только между фракцией № 1 и фракцией № 3 ($p < 0,01$). Отличия между средними в группах нашли своё подтверждение при проведении дисперсного анализа (ANOVA) ($p < 0,05$).

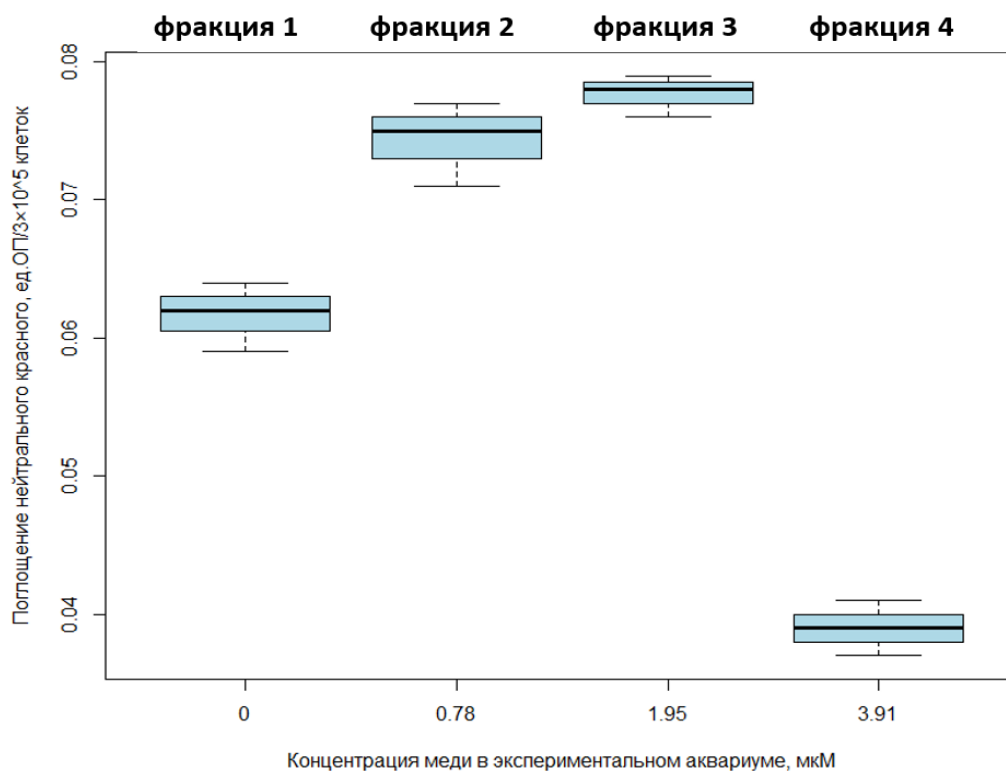


Рисунок 5. Поглощение нейтрального красного целоомцитами морских звезд *Asterias rubens*.

3.6 Анализ уровня экспрессии белка HSC70 в условиях воздействия медью в целоомцитах морской звезды *Asterias rubens*

Белки стресса играют исключительно важную роль в поддержании нормального клеточного гомеостаза, а также в сложном защитном механизме, обеспечивающем выживание клеток в неблагоприятных условиях. Согласно результатам проведенных ранее исследований [Pinsino, 2007; Patruno, 2001], тяжелые металлы стимулируют экспрессию белков теплового шока (HSP) в нескольких морских организмах. В рамках данной работы был проведен анализ белков HSC70/HSP70 методом иммуноблоттинга с целью сравнительного анализа уровня их экспрессии в целоомцитах морских звезд *Asterias rubens*, содержащихся в экспериментальных аквариумах с различной концентрацией меди (0; 0,78; 1,95 и 3,91 мкМ). На рисунке 6 приведены результаты анализа интенсивности полос HSC70/HSP70 для трех морских звезд из каждого экспериментального аквариума. Было показано значимое увеличение уровня экспрессии белков стресса с мол. массой 70 кДа (HSC70/HSP70) при увеличении концентрации меди (ANOVA, $P < 0.05$).

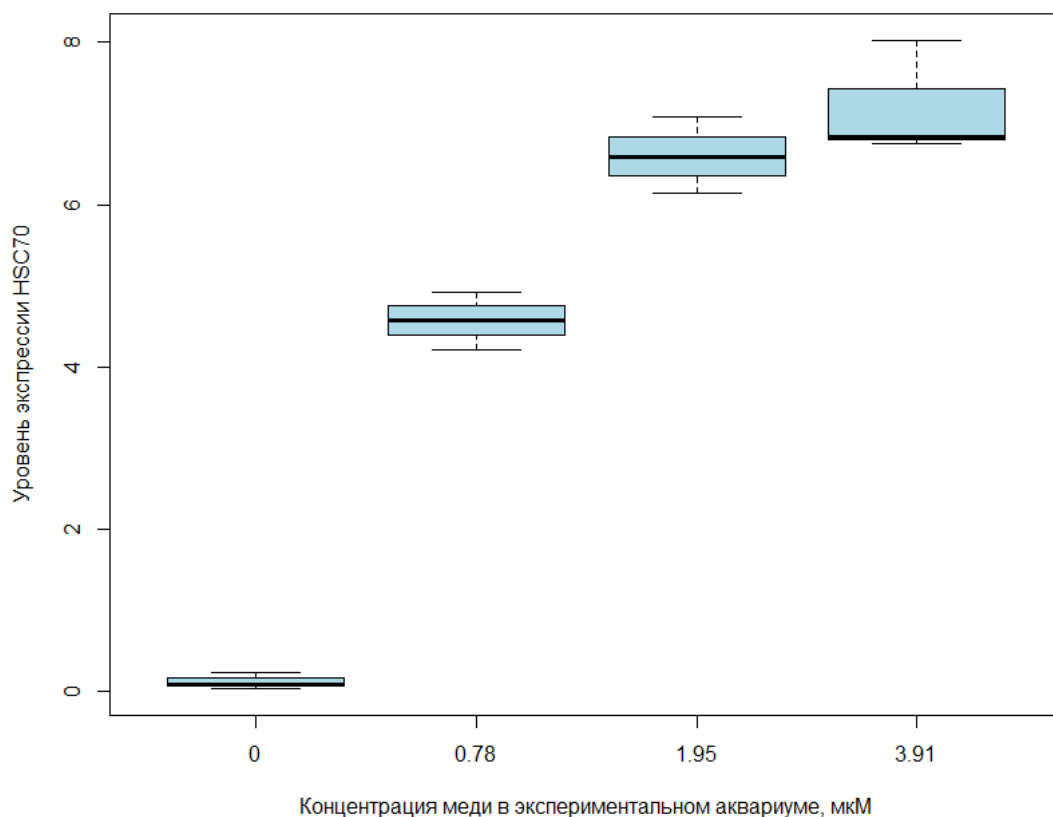


Рисунок 6. Уровни экспрессии белков HSC70/HSP70 в целомотитах *Asterias rubens* при воздействии различными концентрациями меди в экспериментальных аквариумах. Уровень экспрессии HSC70/HSP70, представленный в произвольных единицах, был измерен методом иммуноблоттинга (n=3).

Значимое увеличение в уровне экспрессии стресс-индуцируемых белков наблюдается уже при появлении низких концентраций меди в среде. Аналогичные результаты были получены в работах по анализу уровней экспрессии белков стресса в морских звездах *Asterias rubens*, собранных в различных точках, отличающихся уровнями загрязнения [Matranga, 2012].

Результаты данного исследования позволяют заключить, что анализ уровней экспрессии белков стресса может служить индикатором неблагоприятных изменений на ранних стадиях загрязнения.

3.7 Анализ содержания металлов

Определение количества металлов производили во всем теле *Asterias rubens*, без сегрегации на органы. По данным нелинейной (логарифмической) модели эффективность биоконцентрации уменьшается в следующем ряду: Pb>Cu>(Fe)>Mn>Cd>Co.

Токсичность металлов зависит от их способности накапливаться в организме. С увеличением концентрации металлов в эксперименте увеличивалась

и их концентрация в телах морских звезд. Ранее было отмечено, что беспозвоночные способны избирательно накапливать ионы металлов, необходимых организму, такие как Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Fe^{3+} , выводя из организма абиогенные металлы, такие как Pb^{2+} и Cd^{2+} [Soto, 2013].

Морские звезды *Asterias rubens* проявляют высокий уровень биоаккумуляции, который может быть использован как показатель загрязнения окружающей среды металлами. Данное исследование позволило выявить, что морские звезды *Asterias rubens* более чувствительны к воздействию медью, свинцом и кадмием, чем к другим исследованным металлам. Железо, кобальт и марганец оказывают токсический эффект на морских звезд *Asterias rubens* только в концентрациях, значительно превышающих установленные ПДК.

Обобщение результатов

Результаты исследований позволяют заключить, что наибольшей токсичностью для морских звезд *Asterias rubens*, как и следовало ожидать на основе анализа литературы, обладают ионы меди, приводящие как к снижению выживаемости, так и к изменению поведенческого ответа. ПДК меди, установленное для морских вод региона составляет 0,005 мг/л (0,008 мкМ), тем не менее гибель морских звезд будет наблюдаться лишь при достижении концентрации меди десятикратной ПДК, или увеличении среднего содержания меди в морской воде для данного региона в пять раз. Для остальных металлов среднее содержание в морской воде ниже ПДК, а токсические эффекты наблюдаются при увеличении концентрации в 50-100 раз по сравнению с ПДК, установленного для ионов кадмия и свинца, и 1000 раз для ионов марганца и кобальта. Среднее содержание металлов в водах мирового океана, обычно выражаемое в виде единиц кларка, также значительно ниже тех концентраций, которые вызывают видимые токсические эффекты у морских звезд *Asterias rubens*. За исключением меди, что делает этот элемент наиболее значимым и приоритетным при мониторинге качества морских вод.

Некоторые металлы в норме присутствуют в морских организмах в повышенных концентрациях, которые зависят от степени их вовлеченности в биохимические процессы, а также от механизмов регуляции процессов выведения и распределения этих металлов организмом [Deane, 2005]. Таким образом, токсическое действие ионов некоторых металлов на *Asterias rubens*, таких как кобальт и марганец, наступает при относительно более высоких концентрациях, в отличие от меди, свинца и кадмия, имеющих низкие токсические концентрации.

Результаты данной работы показывают возможность использования морских звезд как индикаторов загрязнения морской среды тяжелыми металлами, а полученные данные о летальных концентрациях позволяют разработать подходы и методы использования биомаркеров и других прижизненных

показателей морских звезд при биотестировании и биоиндикации качества морской среды в условиях повышенной антропогенной нагрузки. Результаты возможно использовать для оценки экологического риска воздействия тяжелых металлов на морские экосистемы.

ВЫВОДЫ

1. Для морских звезд *Asterias rubens* установлены полулетальные концентрации для всех исследованных металлов, за исключением железа. Токсичность исследованных металлов для морских звезд *Asterias rubens* уменьшается в ряду Cu ($\text{ЛК}_{50} = 0,98 \pm 0,16 \text{ мкМ}$) $>$ Pb ($9,6 \pm 0,4 \text{ мкМ}$) $>$ Cd ($15,1 \pm 0,96 \text{ мкМ}$) $>$ Mn ($1449,3 \pm 78,4 \text{ мкМ}$) $>$ Co ($979,5 \pm 35,9 \text{ мкМ}$) по всем исследуемым показателям;

2. Время переворота, как показатель общей жизнеспособности морских звезд *Asterias rubens*, снижается при наличии в воде всех исследуемых металлов с наиболее выраженным эффектом при воздействии Cu , Cd и Pb , начиная с наименьших исследованных концентраций, тогда как для Fe , Co и Mn эффекты наблюдаются при воздействии более высоких концентраций.

3. Увеличение концентрации ионов исследованных металлов приводит к достоверному увеличению числа клеток в целомической жидкости морских звезд *Asterias rubens* и изменению соотношения субпопуляций агранулоцитов, гранулоцитов и мелких клеток-предшественников.

4. Воздействие ионов меди приводит к снижению фагоцитарной активности и жизнеспособности клеток целомической жидкости, а также к увеличению экспрессии стресс-индуцируемых белков.

5. Исследованные концентрации металлов оказывают воздействие на всех уровнях биологической организации морских звезд *Asterias rubens*. Первичный неспецифический ответ наблюдается на молекулярном уровне в первые часы воздействия металлами, тогда как специфический отсроченный ответ проявляется на клеточном уровне и носит доза-зависимый характер, с последующим изменением поведенческих реакций и гибелью животных.

6. Неспецифический токсический эффект на молекулярном уровне биологической организации может служить маркером последующих отсроченных на несколько суток доза-зависимых эффектов, проявляющихся на более высоких уровнях организации морских звезд *Asterias rubens*.

7. Действующие экологические нормативы для морских сред по исследованным металлам значительно ниже концентраций, вызывающих токсические эффекты у морских звезд *Asterias rubens*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI, а также в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.02.08 – Экология

1. Poromov A.A., **Fedyunin V.A.**, Smurov A.V. The Symbiotic Association of Starfish *Asterias rubens* and Copepod *Scottomyzon gibberum* // Journal of Environmental Treatment Techniques. — 2020. — V. 8. — № 4. — P. 1545-1548. IF=0,117.
2. **Fedyunin V.A.**, Poromov A.A., Smurov A.V. The Influence of Copper Ions on Cellular Elements of the Coelomic Fluid of Starfish *Asterias rubens* L. // Cell and Tissue Biology. — 2020. — V. 14. — № 4. — P. 302-308. IF=0,201.
3. **Fedyunin V.A.**, Poromov A.A., Smurov A.V. The Effect of Metal Ions on Survival and Cellular Elements of Coelomic Fluid of Starfish *Asterias rubens* Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Asteroidea) // Contemporary Problems of Ecology. — 2019. — V. 12. — № 4. — P. 386-393. IF=0,366.

Научные статьи, опубликованные в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

4. **Федюнин В.А.**, Поромов А.А., Смуров А.В. Влияние металлов на выживаемость и жизнедеятельность морских звезд *Asterias rubens* // Токсикологический вестник. — 2018. — № 4. — с. 29-34. IF=0,227

Иные публикации:

5. **Федюнин В.А.**, Смуров А.В., Поромов А.А. Исследование воздействия некоторых металлов на симбиотическую ассоциацию морских звёзд *Asterias rubens* L. и копепод *Scottomyzon gibberum* Scott на различных уровнях биологической организации // В сборнике Biodiagnostics and assessment of environmental quality: approaches, methods, criteria and reference standards in ecotoxicology. Book of Abstracts of the International Symposium, 25-28 октября 2016, Москва, Россия, GEOS, 2016. – 434 p, место издания GEOS, с. 401-403;
6. **Федюнин В.А.**, Поромов А.А. Токсичность и биоконцентрация тяжёлых металлов в морских звездах *Asterias rubens*: механистический подход и моделирование // В сборнике Материалы всероссийской конференции с международным участием «Морские биологические исследования: достижения и перспективы», место издания ЭКОСИ-Гидрофизика г. Севастополь, том 3, с 264-267;
7. **Vladimir Fedyunin**, Artem Poromov, Kamila Kydralieva, Andrey Smurov, Toxicity and bioconcentration of heavy metals in sea stars *Asterias rubens*: mechanistic approach and modeling// В сборнике SETAC Europe 27th Annual Meeting Abstract Book, место издания: Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe Brussels, тезисы, г. Брюссель, Бельгия, 2017.

8. **Федюнин В.А.**, Поромов А.А., Смуров А.В., Экотоксические эффекты и адаптация морских звезд при воздействии тяжелых металлов // В сборнике Понт Эвксинский — 2019: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции для молодых ученых по проблемам водных экосистем, посвященной памяти д.б.н., проф. С.Б. Гулина, место издания: Севастополь, Россия, тезисы, с. 138-140.