

Влияние ионов металлов на выживаемость и клеточные элементы целомической жидкости морских звезд *Asterias rubens* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Asteroidea)

В. А. ФЕДЮНИН, А. А. ПОРОМОВ, А. В. СМУРОВ

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
119991, Москва, Ленинские горы, 1
E-mail: aap1309@gmail.com

Статья поступила 04.09.2018

После доработки 06.11.2018

Принята к печати 07.11.2018

АННОТАЦИЯ

В статье представлены результаты исследования влияния ионов металлов (кобальта (Co^{2+}), марганца (Mn^{2+}), железа (Fe^{3+}), свинца (Pb^{2+}), кадмия (Cd^{2+}) и меди (Cu^{2+})) на выживаемость, поведенческий ответ и клеточные элементы целомической жидкости морских звезд *Asterias rubens*. Эксперименты включали одновременную оценку гибели, времени переворота и определение количества и распределения разных типов клеток целомической жидкости морских звезд. Полулетальные концентрации (JK_{50}) установлены для ионов Cu^{2+} ($0,98 \pm 0,16$ мкМ), Pb^{2+} ($9,6 \pm 0,4$ мкМ) и Cd^{2+} ($15,1 \pm 0,96$ мкМ) через 96 ч экспозиции. При действии всех металлов значительно увеличивалось время переворота морских звезд, что свидетельствует о замедлении поведенческих реакций. Увеличение числа циркулирующих в целомической жидкости клеток наблюдалось при воздействии всеми изученными металлами. Значительное увеличение числа целомицитов при воздействии свинцом, медью и кадмием предшествовало гибели животных. Изучено изменение соотношения трех типов целомицитов: без воздействия металлов доля агранулоцитов составляла 61 %, гранулоцитов – 30 % и мелких клеток – 9 %. Воздействие свинцом, медью и кадмием приводило к увеличению доли агранулоцитов, а кобальтом, марганцем и железом – к увеличению доли гранулоцитов. Показано, что медь, кадмий, марганец и кобальт дозозависимо накапливаются в телах морских звезд *Asterias rubens*. Способность металлов к биоконцентрации из воды уменьшается в следующем ряду: $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Mn} > \text{Cd} > \text{Co}$. Результаты работы показывают, что морские звезды *A. rubens* потенциально могут использоваться как биоиндикатор качества морской среды и тест-объект для эколого-токсикологических исследований.

Ключевые слова: *Asterias rubens*, морские звезды, токсичность, металлы, биоконцентрация, целомициты, целомическая жидкость, поведенческая реакция.

Загрязнение морской среды металлами представляет собой серьезную проблему во многих регионах, в том числе и для Белого моря. Так, например, в водах Кандалакшского залива приоритетными загрязняющими веществами являются медь (превышение пре-

дельно допустимых концентраций (ПДК) в 1,4–1,9 раза) и железо (превышение ПДК в 2–4 раза) [Коршенко, 2016]. Ионы металлов, попадая в живые организмы, оказывают влияние на многие физиологические процессы и в особенности на клеточные структуры, участвующие в репарации повреждений и выведении

токсикантов, что может привести к модуляции клеточного цикла, апоптозу, онкогенезу и гибели организма [Wang, Shi, 2009].

Способность металлов проникать в организм, накапливаться в нем и вызывать токсические эффекты подробно изучена на мидиях [Soto et al., 2013], используемых в качестве индикаторов при биомониторинге морских экосистем. Однако для лучшего понимания возможных последствий загрязнения металлами необходимо изучить процессы развития токсических эффектов у организмов, обладающих отличной от мидий физиологией, принадлежащих к другим таксонам и трофическим уровням. Таким модельным объектом может являться морская звезда *Asterias rubens* благодаря ее высокой экологической значимости и широкому распространению в прибрежных экосистемах северных морей, где она является конечным звеном многих пищевых цепей.

В природных популяциях и в условиях краткосрочных экспериментов показано, что ответ на действие ксенобиотиков иглокожие реализуют через гуморальные и клеточные механизмы [Tahseen, 2009]. Превалирующим для иглокожих является клеточный ответ, основанный на особой группе клеток, циркулирующих в целомической жидкости (ЦЖ) – целомоцитах [Coteur et al., 2003]. В состав ЦЖ входят клетки трех основных типов: агранулоциты (также называемые фагоцитарными амебоцитами, клетки без гранул, с хорошо идентифицируемым ядром, окрашивались базофильно до 7 мкм в диаметре различной формы, доля которых в норме составляет 55–80 %), гранулоциты (также называемые красными сферическими клетками или красными амебоцитами, окрашивались эозинофильно до 7 мкм в диаметре округлой или овальной формы, гранулы окрашивались в более темный цвет, ядро не идентифицировалось, доля которых в норме составляет 14–45 %) и мелкие клетки (до 4 мкм в диаметре, окрашивались в синий цвет, доля которых в норме составляет до 2 %) [Козлова и др., 2006]. Целомоциты выполняют функции фагоцитоза и инкапсулирования крупных частиц [Tahseen, 2009]. Для морских звезд, обитающих в районах с повышенной антропогенной нагрузкой, описано изменение в составе и функциональной активности элементов ЦЖ [Coteur et al., 2003].

Несмотря на большой объем информации, отображающей влияние различных металлов на беспозвоночных, действие этих веществ на представителей типа иглокожие до сих пор остается малоизученным. В частности, не установлены летальные и сублетальные концентрации металлов для морских звезд *A. rubens* в морской воде [U. S. Environmental Protection Agency, 2018]. Такие данные, с одной стороны, являются важной составляющей системы оценки экологического риска [Stark, 2005] и, с другой стороны, необходимы при планировании экспериментов, связанных с воздействием металлов на морских звезд для оценки суборганизменных параметров. Также малоизвестно, в каких концентрациях металлы могут представлять опасность и вызывать функциональные изменения, не приводя при этом к немедленной гибели животных. По результатам предварительных экспериментов и по данным литературы показано, что воздействие металлов как в природных условиях, так и в эксперименте приводит к увеличению числа циркулирующих целомоцитов [Coteur et al., 2003; Lindberg, 2012]. При этом закономерности изменения клеточного состава в ответ на воздействие различных концентраций ионов металлов ранее не исследованы.

Для изучения функциональной роли целомоцитов в развитии ответа на повышение концентрации металлов в морской воде в настоящее время проведена серия экспериментов, включающих экспозицию морских звезд *A. rubens* в воде, содержащей хлориды Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} в лабораторных условиях. При оценивании выживаемости и изменения поведенческих реакций животных проведен морфофункциональный анализ клеток ЦЖ. Для установления особенностей клеточного ответа морских звезд формулы клеточного состава ЦЖ соотнесены с экспериментальными концентрациями металлов в воде и биоконцентрацией металлов в теле морских звезд.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор и содержание экспериментальных животных. Морских звезд *A. rubens* собирали вблизи Беломорской биологической станции МГУ им. М. В. Ломоносова (Кандалакш-

ский залив Белого моря). Сбору подлежали только неповрежденные пятилучевые морские звезды диаметром 10–12 см. Их содержали в стеклянных аквариумах объемом 20 л, температура воды составляла 15 ± 2 °С, соленость – 26 ‰, естественный световой цикл.

Реактивы. Использованы растворы хлоридов кобальта ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 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 ($\text{CdCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$) и меди ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$).

Экспозиция в аквариумах. В экспериментальные аквариумы добавляли растворы хлоридов металлов до определенных концентраций в соответствии с табл. 1. Для расчета экспериментальных концентраций металлов использовали значения, кратные ПДК [Приказ..., 2010]. Воду в аквариумах меняли ежедневно наполовину, добавляя в нее раствор хлорида металла до соответствующей концентрации. Каждую исследуемую концентрацию создавали в двух аквариумах, в которых содержалось по 10 животных. Забор ЦЖ и оценку времени переворота (ВП) морских звезд *A. rubens* проводили на первые, четвертые и седьмые сутки после начала эксперимента. Выживаемость оценивалась каждый день до седьмых суток включительно. По окончании эксперимента по пять морских звезд из каждого экспериментального и контрольного аквариумов высушивали, помещали в полиэтиленовые пакеты для дальнейшего измерения концентрации металлов.

Определение ВП. Время переворота измеряли для 10 морских звезд из каждого аквариума в отдельном стеклянном контейнере (размером 30 см × 30 см × 24 см), наполнен-

ном 15 л чистой морской воды. Каждую перевернутую звезду помещали в центр контейнера так, чтобы ни один из ее лучей не касался краев контейнера. Оценивали время, необходимое животному для переворота с аборальной на оральную сторону. Измерения проводили в трех повторах для каждой звезды.

Забор клеток ЦЖ. ЦЖ извлекали из кончика луча морских звезд *A. rubens* при помощи шприца объемом 1 мл не менее чем у пяти животных из каждого экспериментального и контрольного аквариумов на первые, четвертые и седьмые сутки от начала эксперимента. Далее ЦЖ каждой морской звезды сливали в отдельные пробирки, содержащие равный объем солевого раствора без кальция и магния (CMFSS) с добавлением 14 мМ ЭГТА (антикоагулянт) и помещали на лед.

Определение числа клеток в ЦЖ. 100 мкл ЦЖ отбирали в отдельные пробирки, добавляли к ним 10 мкл 10%-го раствора толуидинового синего, перемешивали, выдерживали 30 мин, после чего проводили подсчет клеток под микроскопом в камере Горяева. Число лейкоцитов оценивали в двух повторах у пяти морских звезд *A. rubens* из каждого аквариума на первые (только для меди) и на четвертые и седьмые сутки от начала эксперимента (для всех остальных металлов).

Анализ клеточного состава ЦЖ. 200 мкл ЦЖ переносили на предметное стекло, после чего выдерживали на воздухе в течение 30 мин, избыток жидкости удаляли, стекла высушивали. Затем клетки фиксировали 15 мин в метаноле с последующим окрашиванием 5%-м раствором Романовского – Гимзы в течение 20 мин. Избыток красителя удаля-

Т а б л и ц а 1

Концентрации ионов исследуемых металлов в экспериментальных аквариумах

Концентрация	Cu^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{3+}	Co^{2+}
ПДК, мкг/л [Коршенко, 2015]	5	10	10	50	50	5
Средняя концентрация металлов в Кандалакшском заливе, мкг/л [Приказ..., 2010]	5,5	1,5	0,19	6,15	27	Д. о.
ПДК, мкМ	0,078	0,048	0,089	0,909	0,893	0,085
10 × ПДК, мкМ	0,78	0,48	0,89	9,09	8,93	0,85
25 × ПДК, мкМ	1,95	–	–	–	–	2,125
50 × ПДК, мкМ	3,91	–	4,46	45,45	–	–
75 × ПДК, мкМ	5,86	–	–	–	–	–
100 × ПДК, мкМ	7,81	4,83	8,93	91	89,29	8,47
200 × ПДК, мкМ	–	9,66	17,86	182	178	16,95

П р и м е ч а н и е. Д. о. – данные отсутствуют, прочерк – концентрация не была использована.

ли, смывая дистиллированной водой, высушивали, затем анализировали под микроскопом. Процентное соотношение различных клеток оценивали, как минимум, у пяти морских звезд *A. rubens* из каждого экспериментального и контрольного аквариумов на первые, четвертые и седьмые сутки от начала эксперимента. В каждой пробе подсчитывали 500 клеток ЦЖ.

Измерение концентрации металлов.

По окончании эксперимента морских звезд *A. rubens* высушивали в термостатном шкафу. Концентрацию металлов измеряли на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой ICP-MS 7500a (Agilent Technologies, США) в Химико-аналитическом центре факультета почв [Методика, 2009]. В качестве контроля использовался раствор "Control solution for ICP MS" калибровочного стандарта "Standard solutions for ICP MS" от фирмы "Agilent".

Статистический анализ. 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 проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для межгрупповых сравнений количественных показателей применяли *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок и его непараметрический аналог – *U*-критерий Манна – Уитни. Для множественных сравнений использовали тест Тьюки. При осуществлении статистических процедур различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Для оценки выживаемости представлена четырехпараметрическая логистическая регрессионная модель (пакет "drc"), на основе которой рассчитаны полуметалельные концентрации (LK_{50}) после четырех суток экспозиции. 96-часовая (четверо суток) продолжительность выбрана как наиболее широко используемая временная точка в стандартных токсикологических экспериментах, принятых в методиках ISO и OECD. Максимально переносимые концентрации (МПК) определены как концентрации, не приводящие к видимому изменению исследуемых биологи-

ческих параметров. Связь между концентрацией металлов в морских звездах и экспериментальных аквариумах оценивали с помощью регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Параметры качества воды. Температура колебалась от 13,4 до 15,2 °С, соленость – от 25 до 26 единиц фактической солености, рН воды – от 8,0 до 8,2.

Выживаемость (МПК и LK_{50}). Наибольшее токсическое действие среди исследуемых металлов наблюдалось для хлорида меди (табл. 2). Максимально переносимая концентрация для Cu^{2+} составила 0,078 мкМ, гибель наступала уже на четвертые сутки эксперимента (при 1,95 мкМ) и достигала 100 % на седьмые сутки во всех аквариумах при концентрации Cu^{2+} выше 0,78 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 семи суток эксперимента, 100%-я гибель морских звезд отмечалась при концентрации Pb^{2+} больше 9,66 мкМ. Похожие результаты получены для Cd^{2+} , однако полная гибель в экспериментах с Cd^{2+} не наблюдалась. Для Cd^{2+} МПК составила 4,46 мкМ, гибель на седьмые сутки при 8,93 и 17,86 мкМ составила 10 и 90 % соответственно. Воздействие Mn^{2+} , Fe^{3+} и Co^{2+} не приводило к летальным эффектам. МПК Co^{2+} , Fe^{3+} и Mn^{2+} составили 16,95, 178 и 182 мкМ соответственно.

LK_{50} для Cu^{2+} составила $0,98 \pm 0,16$ мкМ, Pb^{2+} – $9,6 \pm 0,4$ мкМ, Cd^{2+} – $15,1 \pm 0,96$ мкМ.

Время переворота. В ходе эксперимента наблюдался небольшой рост ВП у морских звезд в контрольном аквариуме. Время переворота до начала эксперимента составило $4 : 28 \pm 1 : 30$ мин, на четвертые сутки – $4 : 58 \pm 2$ мин, на седьмые сутки – $6 : 20 \pm 2$ мин. Максимальное увеличение ВП наблюдалось после четырех и семи суток воздействия медью, свинцом и кадмием. При воздействии Cu^{2+} в концентрациях выше 1,95 мкМ наблюдалась потеря подвижности и гибель животных. Увеличение ВП при воздействии остальными металлами происходило только при воздействии максимальными дозами и составляло для Co^{2+} ($16,95$ мкМ) $9 : 50 \pm 3$ мин на четвертые сут-

ки и $10 : 30 \pm 4$ мин на седьмые сутки, для Fe^{3+} (178 мкМ) – $7 : 30 \pm 2$ мин на четвертые сутки и $8 : 25 \pm 3$ мин на седьмые сутки, для Mn^{2+} (182 мкМ) – $8 : 25 \pm 2$ мин на четвертые сутки и $9 : 15 \pm 3$ мин на седьмые сутки.

Общее число целомоцитов. Количество клеток в целомиической жидкости в начале эксперимента составило $52,7 \pm 43,7 \times 10^3$ кл./мкл

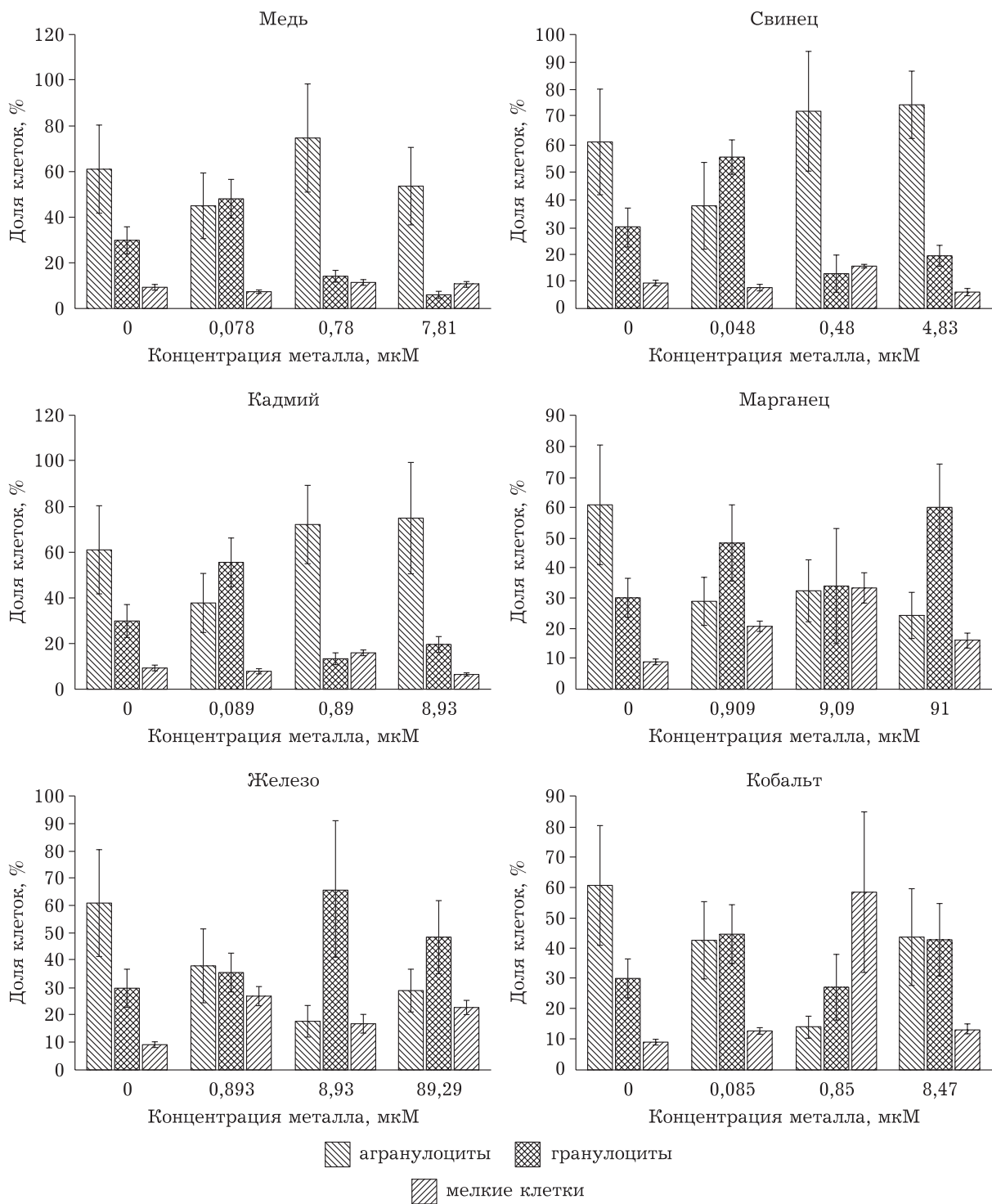
(медиана $37,7 \times 10^3$ кл./мкл). После четырех суток наблюдалось снижение числа целомоцитов у морских звезд в контрольном аквариуме до $35,2 \pm 9,6 \times 10^3$ кл./мкл. После четырех и семи суток эксперимента среднее количество целомоцитов у морских звезд в экспериментальных аквариумах оказалось выше, чем у контрольных животных ($p < 0,05$), резуль-

Т а б л и ц а 2

Изменение числа целомоцитов и выживаемость морских звезд *A. tuberosa* в ответ на воздействие металлов

Концентрация ионов металла, мкМ	Сутки		
	1-е	4-е	7-е
	Количество клеток в ЦЖ, $\times 10^3$ /мкл		
Контроль	$21,0 \pm 19,4$ (20)	$16,2 \pm 30,8$ (20)	$35,2 \pm 9,6$ (20)
	Cu²⁺		
0,078	$13,8 \pm 13,8$ (20)	$8,4 \pm 6,1$ (20)	$31,4 \pm 34,8$ (20)
0,78	$7,8 \pm 19,9$ (20)	$38,3 \pm 79,7$ (20)	$35,8 \pm 24,1$ (4)
1,95	$10,5 \pm 8,9$ (20)	$33,9 \pm 42,1$ (18)	Д. о.
3,91	$11,9 \pm 6,8$ (20)	$111,9 \pm 108,8$ (14)*	Д. о.
5,86	$58,7 \pm 22,1$ (20)*	$189,3 \pm 97,1$ (12)*	Д. о.
7,81	$138 \pm 94,1$ (20)*	Д. о. (0)	Д. о.
	Pb²⁺		
0,048	Д. о.	$50,37 \pm 75,98$ (20)	$40,4 \pm 28,75$ (20)
0,48	Д. о.	$21,57 \pm 8,1$ (20)	$31,57 \pm 25,12$ (8)
4,83	Д. о.	$34,5 \pm 39,3$ (12)	$64,5 \pm 38,9$ (4)
9,66	Д. о.	$150 \pm 26,2$ (4) *	Д. о. (0)
	Cd²⁺		
0,089	Д. о.	$17,9 \pm 16,3$ (20)	$35,6 \pm 21,7$ (20)
0,89	Д. о.	$19,7 \pm 15,6$ (20)	$48,6 \pm 26,6$ (20)
4,46	Д. о.	$102,84 \pm 141,7$ (20)	$78,6 \pm 51,3$ (18)
8,93	Д. о.	$51,14 \pm 48,9$ (20)*	$84,6 \pm 32,4$ (2)*
17,86	Д. о.	$218,16 \pm 151,05$ (6)*	Д. о. (2)
	Fe³⁺		
0,893	Д. о.	$37,9 \pm 9,7$ (20)	$35,9 \pm 17,8$ (20)
8,93	Д. о.	$53,31 \pm 66,32$ (20)	$49,6 \pm 20,3$ (20)
89,29	Д. о.	$34,7 \pm 19,6$ (20)	$58,4 \pm 25,4$ (20)
178	Д. о.	$75,4 \pm 31,1$ (20)*	$96,6 \pm 35,4$ (20)*
	Mn²⁺		
0,909	Д. о.	$26,15 \pm 10,3$ (20)	$34,7 \pm 21,6$ (20)
9,09	Д. о.	$34,8 \pm 15,8$ (20)	$39,4 \pm 19,3$ (20)
45,45	Д. о.	$46,4 \pm 20,3$ (20)	$45,8 \pm 19,3$ (20)
91	Д. о.	$57,6 \pm 21,0$ (20)	$90,7 \pm 25,4$ (20)*
182	Д. о.	$105 \pm 65,2$ (20)*	$132,4 \pm 31,2$ (20)*
	Co²⁺		
0,085	Д. о.	$26,5 \pm 13,04$ (20)	$39,7 \pm 12,3$ (20)
0,85	Д. о.	$48,1 \pm 23,6$ (20)	$50,4 \pm 12,7$ (20)
8,47	Д. о.	$46,99 \pm 14,2$ (20)	$91,3 \pm 18,7$ (20)*
16,95	Д. о.	$57,3 \pm 19,4$ (20)	$102,4 \pm 21,7$ (20)*

П р и м е ч а н и е. Среднее $\pm SD$ (число живых особей), Д. о. – данные отсутствуют (определение числа не проводилось или происходила полная гибель организмов); * – тест множественного сравнения Тьюки, различия значимы при $p \leq 0,5$.



Клеточный состав ЦЖ морских звезд *Asterias rubens* через четверо суток воздействия, усредненные для пяти животных значения (доля клеток $\pm SE$)

таты приведены в табл. 2. На четвертые сутки эксперимента увеличение числа клеток фиксировалось при воздействии свинцом, медью и кадмием, после чего наступала гибель животных в этих группах к пятым суткам экспозиции.

Распределение клеток по группам. Микроскопическое исследование клеточного состава целомической жидкости позволило выделить три описанных ранее клеточных морфотипа: агранулоциты, гранулоциты и мелкие клет-

ки. Для морских звезд, содержащихся в контрольном аквариуме, доля агранулоцитов составила 61 %, гранулоцитов – 30 % и мелких клеток – 9 % (рисунок) через четверо суток воздействия. При этом наблюдались значительные различия в распределении клеток между отдельными звездами. Доля мелких клеток увеличивалась при воздействии всеми исследуемыми металлами, максимально до 22 %. Доля агранулоцитов увеличивалась в ответ на воздействие Cu^{2+} , Pb^{2+} и Cd^{2+} до 65–75 %. С другой стороны, в ответ на воздействие Mn^{2+} , Fe^{3+} и Co^{2+} увеличивалась доля гранулоцитов – до 43–60 %. Таким образом, металлы можно разделить на две “груп-

пы”, различия в соотношении разных типов целомацитов между этими “группами” оказались значимы ($p < 0,05$).

Биоконцентрация металлов. В табл. 3 приведены концентрации металлов, определенные в высушенных морских звездах. По данным нелинейной (логарифмической) модели способность металлов к биоконцентрации из воды уменьшается в следующем ряду: $\text{Pb} > \text{Cu} > (\text{Fe}) > \text{Mn} > \text{Cd} > \text{Co}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ответ *A. rubens* на токсическое воздействие металлов реализуется на разных уровнях биологической организации, как на клеточном,

Т а б л и ц а 3

Биоконцентрация металлов (среднее $\pm SD$ (мг/кг сухого веса), $n = 5$), нелинейная регрессионная модель после семи суток воздействия

Ион металла	[Me] ак		[Me] мз, мг/кг сухого веса	Нелинейная регрессия		
	мкМ	мг/л		Уравнение	R^2	p
Cu^{2+}	Д. о.	0	$3,63 \pm 0,76$	$[\text{Cu}]_{\text{мз}} = 6,47 \ln[\text{Cu}]_{\text{ак}} + 32,8$	0,94	0,059
	0,078	0,005	$3,60 \pm 0,69$			
	0,78	0,05	$14,95 \pm 4,6$			
Pb^{2+}	0	0	$6,44 \pm 1,68$	$[\text{Pb}]_{\text{мз}} = 2,52 \ln[\text{Pb}]_{\text{ак}} + 111,6$	0,82	0,001
	0,048	0,01	$9,36 \pm 2,5$			
	0,48	0,1	$25,66 \pm 4,69$			
Cd^{2+}	4,83	1	$133,80 \pm 31,8$	$[\text{Cd}]_{\text{мз}} = 1,19 \ln[\text{Cd}]_{\text{ак}} + 10,6$	0,65	0,001
	0	0	$3,34 \pm 1,02$			
	0,089	0,01	$3,97 \pm 0,9$			
Mn^{2+}	0,89	0,1	$4,52 \pm 1,1$	$[\text{Mn}]_{\text{мз}} = 1,65 \ln[\text{Mn}]_{\text{ак}} + 10,6$	0,42	0,004
	8,93	1	$13,54 \pm 4,2$			
	0	0	$3,61 \pm 0,78$			
Fe^{3+}	0,909	0,05	$3,15 \pm 0,9$	$[\text{Fe}]_{\text{мз}} = 2,7848 \ln[\text{Fe}]_{\text{ак}} + 41,4$	0,51	0,6
	9,09	0,5	$4,95 \pm 0,98$			
	91	5	$12,28 \pm 2,9$			
Co^{2+}	0	0	0,00	$[\text{Co}]_{\text{мз}} = 0,86 \ln[\text{Co}]_{\text{ак}} + 4,4$	0,8	0,002
	0,893	0,05	$36,97 \pm 20,2$			
	8,93	0,5	$46,75 \pm 25,7$			
	89,29	5	$42,16 \pm 23,8$			
	0,085	0,05	$0,40 \pm 0,07$			
	0,85	0,5	$0,63 \pm 0,11$			
	8,47	5	$4,40 \pm 1,21$			

П р и м е ч а н и е. [Me]ак – концентрация ионов металлов в аквариуме; [Me]мз – концентрация металлов в морских звездах. Д. о. – данные отсутствуют.

так и на уровне всего организма. Первая часть работы включала оценку выживаемости и поведенческого ответа на воздействие металлов. Их токсическое действие, оцененное по снижению выживаемости, уменьшается в ряду $Cu > Pb > Cd$, ЛК₅₀ для которых составила $0,98 \pm 0,16$, $9,6 \pm 0,4$, $15,1 \pm 0,96$ мкМ соответственно.

Увеличение концентрации всех исследованных металлов приводило к нарушению координации и снижению двигательной активности морских звезд, тем самым увеличивая время, необходимое для осуществления полного переворота. Влияние металлов на данный параметр у морских звезд ранее показано только для кадмия и марганца. Так, в аналогичной работе [Canty, 2009] Cd^{2+} в концентрациях от 100 до 320 мкг/л ($0,89-2,67$ мкМ) не приводил к изменению скорости переворота морских звезд *A. rubens* по сравнению с контролем. В данной работе уменьшение данного процесса наблюдали при концентрациях, превышающих 4,46 мкМ. Для Mn^{2+} происходило уменьшение скорости переворота при содержании 15 мг/л (68 мкМ) только к третьей неделе воздействия, при менее длительном воздействии – до одной недели, аналогичный результат фиксируется только при более высоких концентрациях (182 мкМ) [Lindberg, 2012]. Время переворота *A. rubens* в данном исследовании можно использовать в качестве индикатора стрессового состояния, вызванного длительным токсическим действием.

Число клеток в ЦЖ увеличивается в ответ на воздействие металлов уже через сутки в экспериментах с Cu и через четверо суток в экспериментах с остальными металлами (Cd , Pb , Fe , Co и Mn). Увеличение числа целоцитов можно связать с реализацией процессов детоксикации: они могут выступать в роли барьера, препятствующего распространению металла по органам морской звезды, участвовать в выведении связанных с белками металлов. Эти результаты подтверждают теорию преваляющей роли клеточного ответа при воздействии ксенобиотиков у беспозвоночных [Soto et al., 2013].

Распределение клеток по морфотипам (субпопуляциям) у морских звезд *A. rubens*, не подверженных воздействию ионов металлов, соответствовало литературным данным [Козлова и др., 2006]. Увеличение доли

гранулоцитов (красных амебоцитов) в ответ на воздействие ионов металлов связано с быстрым делением клеток целомического эпителия, который присутствует у всех иглокожих и описан для морских звезд *A. rubens* [Candia Carnevali et al., 1995; Pinsino et al., 2008]. В цитоплазме красных амебоцитов содержатся хорошо различимые гранулы [Branco, Figueiredo, 2014], 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 к органам выделения. Массовая миграция гемоцитов (клеток ЦЖ беспозвоночных) в жабры, пищеварительный тракт и другие органы детоксикации в условиях воздействия металлами (кадмием, медью, свинцом) ранее показана в экспериментах с моллюсками. Известно о возможности выведения Cd и Cu у моллюсков путем их связывания со специфическими белками, называемыми металлохioneинами, а также о путях выведения металлов путем включения в лизосомы фагоцитов [Soto et al., 2013].

В проведенной работе подтверждено увеличение числа мелких клеток при воздействии всеми исследуемыми металлами, что ранее показано другими авторами [Козлова и др., 2006], как общий ответ на стресс, с одной стороны, и источник новых клеток – с другой. Доля агранулоцитов возрастала в ответ на воздействие Cu^{2+} , Pb^{2+} и Cd^{2+} , при этом в ответ на воздействие Mn^{2+} , Fe^{3+} и Co^{2+} увеличивалась доля гранулоцитов. Соответственно, эти две группы металлов можно разделить на наиболее и наименее токсичные.

Токсичность металлов зависит от их способности накапливаться в организме. С увеличением концентрации металлов в эксперименте повышалась она и в телах морских звезд. Ранее отмечено, что беспозвоночные способны избирательно накапливать ионы некоторых металлов, таких как Co^{2+} , Mn^{2+} и Fe^{3+} , необходимых организму для протекания тех или иных метаболических процессов, вывода из организма ионов других металлов, таких как Pb^{2+} и Cd^{2+} , вызывающих токсические эффекты в малых концентрациях [Soto

et al., 2013]. В связи с этим можно предположить, что при воздействии нелетальных концентраций Mn^{2+} , Fe^{3+} и Co^{2+} увеличение доли гранулоцитов, участвующих в связывании металлов на ранних стадиях воздействия, может определяться аккумуляцией этих металлов как необходимых организму элементов. При этом в ответ на воздействие наиболее токсичными металлами (Pb^{2+} и Cd^{2+}) клеточный ответ реализуется через увеличение доли агранулоцитов как клеток, способных к миграции и выведению металлов из организма.

Различные параметры могут быть использованы для оценки риска воздействия ксенобиотиков. Так, значения МПК могут применяться как аналог безопасных уровней в морской среде. Несмотря на то что смертность наблюдается только при воздействии высоких концентраций, развитие токсического эффекта можно обнаружить на более низких уровнях организации при воздействии значительно меньших, чем летальные, концентраций. В целом увеличение числа клеток ЦЖ и времени переворота морских звезд, наблюдаемые при воздействии меньших концентраций, всегда предшествовали гибели животных, что свидетельствует о последовательном развитии токсического действия.

Суммируя вышесказанное можно отметить, что морские звезды *A. rubens* более чувствительны к ионам Cu^{2+} , Pb^{2+} и Cd^{2+} , в то время как другие металлы, участвующие в физиологических реакциях морских звезд, оказывают токсический эффект только в относительно высоких концентрациях. Клетки ЦЖ морских звезд потенциально могут служить индикатором общего состояния организма в условиях загрязнения морской воды металлами. Морские звезды *A. rubens* проявляют высокий уровень биоаккумуляции, измерение которого может использоваться как показатель загрязнения окружающей среды металлами.

ЛИТЕРАТУРА

- Козлова А., Петухова О., Пинаев Г. Анализ клеточных элементов целомической жидкости на ранних сроках регенерации морской звезды *Asterias rubens* L. // Цитология. 2006. Т. 48, вып. 6. С. 175–183.
- Курченко А. Н. Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2015. М.: Наука, 2016. 184 с.
- Методика выполнения измерений массовой доли элементов в твердых минеральных объектах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent ICP-MS 7500. ФР. 1.31.2009.06787. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2009. 56 с.
- Приказ Федерального агентства по рыболовству от 18 января 2010 г. № 20 “Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения”. 2010. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/2070984/>.
- Branco P., Figueiredo D. New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress // OA Biol. 2014. Vol. 18. P. 1–2.
- Candia Carnevali M. D., Bonasoro F., Lucca E., Thorn-dyke M. C. Pattern of cell proliferation in the early stages of arm regeneration in the feather star *Antedon mediterranea* // J. Exp. Zool. 1995. Vol. 272. P. 464–474.
- Canty M. Marine pollution and echinoderms: a biomarker study integrating different levels of biological organisation. University of Plymouth, 2009. 259 p.
- Coteur G., Gillan D., Joly G. et al. Field contamination of the starfish *A. rubens* by metals. Part 2: Effects on cellular immunity // Environ. Toxicol. Chem. 2003. Vol. 22. P. 2145.
- Lindberg J. The effects of manganese on the motoric skills of the sea star *A. rubens*. 2012. 24 p. URL: https://bioenv.gu.se/digitalAssets/1586/1586140_johannalindberg.pdf (accessed on 20/03/2018).
- Pinsino A., Della Torre C., Sammarini V. et al. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: A field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy // Cell Biol. Toxicol. 2008. Vol. 24. P. 541–552.
- Soto M., Marigómez I., Cancio I. Biological aspects of metal accumulation and storage. 2013. URL: http://www.ehu.es/europeanclass2003/biological_aspects_of_metal_accu.htm.
- Stark J. How closely do acute lethal concentration estimates predict effects of toxicants on populations // Integr. Environ. Assess. Manag. 2005. Vol. 1. P. 109–113.
- Tahseen Q. Coelomocytes: Biology and possible immune functions in invertebrates with special remarks on Nematodes // Int. Journ. Zool. 2009. Vol. 2009. P. 13.
- U. S. Environmental Protection Agency. ECOTOX User Guide: ECOTOXicology Knowledgebase System. Version 4.0. 2018. URL: <http://www.epa.gov/ecotox>
- Wang S., Shi X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis // Mol. Cell. Biochem. 2001. Vol. 222. P. 3–9.

The effect of metal ions on the survival and coelomic fluid cells of starfish *Asterias rubens* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Asteroidea)

V. A. FEDYUNIN, A. A. POROMOV, A. V. SMUROV

Lomonosov Moscow State University
119234, Moscow, Leninskie gory, 1
E-mail: aap1309@gmail.com

Toxic effects of various concentrations of cobalt, manganese, iron, lead, cadmium and copper on survival, behavioral response of starfish *Asterias rubens*, and changes in cellular elements of coelomic fluid (CF) in response to exposure to these metals were investigated. The experiments included survival evaluation, evaluation of the righting time, number of cells and cell distribution among different groups. Half-lethal concentrations measured for copper ($0.98 \pm 0.16 \mu\text{M}$), lead ($9.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$) and cadmium ($15.1 \pm 0.96 \mu\text{M}$). Exposure of these metals leads to a significant righting time growth. Number of cells circulating in CF increased under lead, cadmium and copper exposure, under the highest doses of cobalt, manganese and iron. Exposure to Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} resulted in an increase in the proportion of agranulocytes, Co^{2+} , Mn^{2+} and Fe^{3+} leads to an increase in the percentage of red amoebocytes (granulocytes) in the CF. It was shown that Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} are dose-dependent bioconcentrated in bodies of *Asterias rubens*.

Key words: *Asterias rubens*, starfish, toxic effect, metals, bioconcentration, coelomocytes, coelomic fluid, behavioral response.