

Srpsko društvo za zaštitu voda. 40 konferencija o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda. Voda 2011. Zlatibor 7-9 jun 2011. pp.297-304

UTICAJ ZAGAĐENJA MORSKE VODE U BOKOKOTORSKOM ZALIVU NA EMBRIONALNO RAZVIĆE PJEGAVOG MORSKOG JEŽA

Sphaerechinus granularis

Ivan Milošević¹, Yuri B. Shmukler², Milorad Gojković¹, Sanja Vlasisavljević³, Aleksandra Redžić¹, Zoran Gačić⁴, Nina Milošević⁵, Ljubisav Rakić⁶

(1) Institute for Marine Biology, Kotor, University of Montenegro; (2) N.K.Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia; (3) Faculty of Science, Department of chemistry, biochemistry and environmental protection, University of Novi Sad; (4) Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade; (5) Emergency medical service Kotor; (6) Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia;

Kontakt adresa : imilosevic@ibmk.org

REZIME :

Embrioni i larve morskog ježa su izvanredan materijal za brzi, jeftin i pouzdan skrining i testiranje farmakološki aktivnih supstanci i zagađivača spoljašnje sredine. Ispitivani su efekti fekalnog zagađenja vode Kotorskog zaliva i žive u sedimentima i vodi Risanskog zaliva, na embrionalno razviće pjegavog morskog ježa (*S. granularis*). Dobijeni rezultati ukazuju na malformacije tj. blokadu adhezije blastomera i normalnog embrionalnog razvića. Ovo narušavanje razvića govori o potiskivanju procesa normalne egzocitoze kortikalnih granula u toku reakcije aktivacije koja počinje oplodavanjem, odgovora „prstenastim talasom“ i povećanim nivoom slobodnih jona kalcijuma u primembranskom sloju.

KLJUČNE RIJEČI : Embrioni morskog ježa, ekotoksikologija, živa, fekalno zagađenje

EFFECT OF SEA WATER POLLUTION OF THE BOKA KOTORSKA BAY OF THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF SPOTTED SEA URCHIN *Sphaerechinus granularis*

ABSTRACT :

Sea urchin gametes, embryos and larvae can be used for quick, cheap and reliable screening and testing of pharmacologically active substances and pollutants. Effects of fecal pollution of Kotor Bay water and mercury in sediments and water of Risan Bay on embryonic development of spotted sea urchin (*S. granularis*), were examined. The results showed malformations, blockade of adhesion blastomeres and normal embryonic development. This distortion of development is about the suppression of the normal process of cortical granule exocytosis during activation reaction that starts fertilization, response "ring wave" and an increased level of free calcium ions in intimately membrane layer.

KEYWORDS : Sea Urchin Embryos, Ecotoxicology, mercury, faecal pollution

UVOD :

Poznato je da embrionalno razviće morskog ježa predstavlja izuzetno pogodan model za izučavanje efekta hemijskih materija, između ostalih farmakoloških preparata i polutanata okružavajuće sredine (Buznikov, 1979; Buznikov et al., 2008).

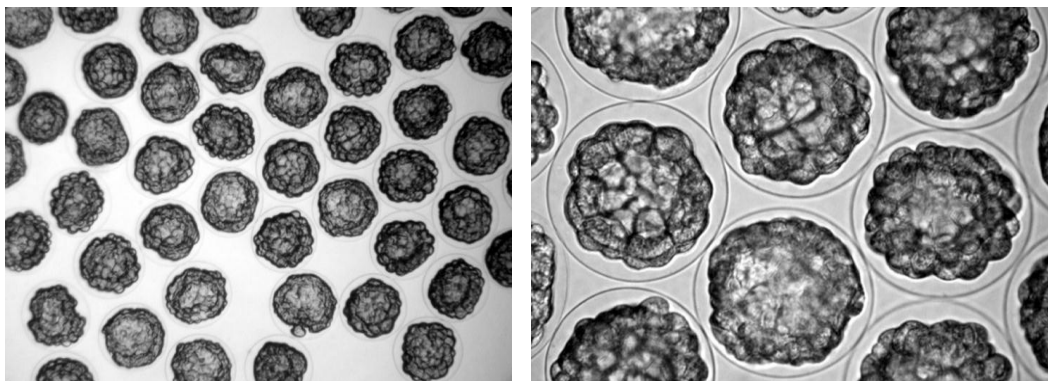
Kod ovog model sistema moguće je kontrolisati slijedeće procese :

- a. oplodavanje,
- b. citokinezu u toku dijeljenja,
- c. formiranje kompletnog embriona,
- d. formiranja pokretnih larvi, izleganje i
- e. gastrulacija.

Narušavanje ovih procesa dovodi do promjena mehanizama razvića embriona, kao što su transmitterska regulacija, ćelijska pokretljivost (adhezija blastomera posle deljenja) međusobni odnos blastomera, itd. Osnovna prednost ovih životinjskih modela je u testiranju defekata u razvoju uzrokovanih nekom neuroaktivnom supstancom u velikim, homogenim populacijama pojedinih faza razvoja embriona i larvi.

MATERIJAL I METODE :

Eksperimenti su rađeni u Institutu za biologiju mora (Kotor). Adultni primjerci pjegavog morskog ježa *Sphaerechinus granularis* su sakupljeni ronjenjem neposredno prije eksperimenata. Uzimanje gameta i inkubacija oplodjenih jaja opisana je ranije (Buznikov and Podmarev 1990; Buznikov et al. 2001, 2003). Jaja i sperma je su dobijeni injektiranjem zrelih životinja sa 1.0 ml 0.55 M KCl, a embrioni i larve su kultivisane na 21°C u vještačkoj morskoj vodi (ASW; 445 mM NaCl, 24.6 mM MgCl₂, 18.1 mM MgSO₄, 9.2 mM KCl, 2.36 mM NaHCO₃, 11.5 mM CaCl₂; pH 7.5). Fertilizacija jaja je vršena upotrebom kombinovane sperme 2-3 mužjaka. Jaja od 10 ženki su korišćena po pravilu „jedna ženka – jedna serija eksperimenata“. Kako je praktično korišćeno manje od 1% jaja svake ženke, višak razvijenih embriona i larvi, kao i odraslih ježeva nakon uzimanja gameta vraćano je u more ronjenjem (na mjesto sakupljanja) radi očuvanja populacije. Embrioni i larve su stavljeni u posudu za inkubaciju sa 12 gnijezda (~100 embriona po gnijezdu). Supstance su dododavane u gnijezdo u stadijumu 2-4 ćelije (1h20min – 2h20min poslije oplodnje jaja) ili kasnije u stadiju blastula 2 ili mladi pluteus 2 (11h 20min or 32h 50min poslije oplodnje). Efekti supstanci na fenotipove embriona ili larvi su dokumentovani digitalnom foto/video grafijom na Olympus Univerzalniom istraživačkom mikroskopu model VANOX sa digitalnom camerom SP-500 UZ; Istraživanja su počinjala 2-4 časa nakon početka tretmana sa snimanjem radi dokumentovanja efekata.



Sl. 1 i 2. Embrioni kontrolne grupe pjegavog ježa *Sphaerechinus granularis*
Fig. 1 i 2. Control group embryos of *Sphaerechinus granularis*

REZULTATI I DISKUSIJA :

U toku rada u prethodnim godinama ustanovljeno je da se embrioni *Sphaerechinus granularis* u ovom periodu godine razvijaju normalno, tj. procenat normalnog oplođenja je 95% i više. U eksperimentima na *S. granularis* u periodu od 20. juna do 26. juna 2010. godine registrovano je potpuno odsustvo oplođavanja jajnih ćelija pri normalnoj pokretljivosti spermatozoida. Zamjena prirodne morske vode sa vještačkom (Buznikov, Podmarev, 1974) nije uticala na nivo oplođenja. Kako izgleda, ova pojava nije bila povezana sa smanjenjem saliniteta, što je potvrđeno kontrolnim eksperimentima (3 eksperimenta) sa razrijeđenom morskom vodom (3, 5 i 10 ‰), a takođe ni hidrografskim podacima (Laboratorija za hidrografiju IBMK).

HIDROGRAFIJA						
IBM	Temp (°C)	Sal (‰)	O ₂ (mg/L)	pH	Providnost (m)	Provodljivost mS/cm
15. jun	25.7	12.4	8.85	8.26	8.5	20.71
23. jun	16.9	3.53	10.12	8.26	8	6.45
15.jul	23.7	20.8	8.33	8.28	6.5	33.3
26. jul	25.8	28.6	7.05	8.13	7	44.3
11. avgust	21.1	29.6	7.0	8.12	6.5	45.79
26. avgust	25.8	28.6	7.19	8.13	6.5	44.3
16.septembar	21.7	31.0	7.99	8.18	8	47.6
30.septembar	17.7	25.4	8.36	8.31	8	39.7

NUTRIJENTI					
IBM	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	Total P	SiO ₄ ⁻
15. jun	0.119	3.756	0.045	0.705	12.713
23. jun	0.099	10.696	0.267	/	5.305
15.jul	0.158	2.187	0.178	/	3.203
26. jul	0.198	1.341	0.267	0.564	1.602
11. avgust	0.020	8.764	0.267	2.163	12.513
26. avgust	0.277	4.919	0.312	0.940	5.906
16.septembar	0.238	4.260	0.134	2.351	12.613
30.septembar	0.158	8.488	0.223	0.142	15.415

Napomena : Podaci su dobijeni od Hidrografske laboratorije IBMK

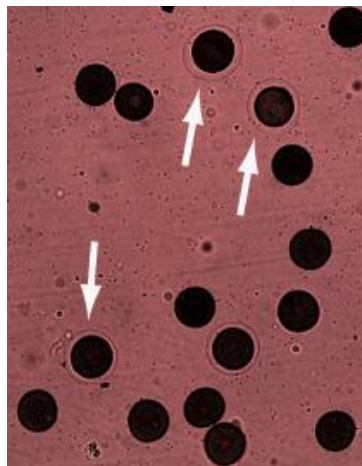
Međutim mikrobiološka analiza pozicije na kojoj su ježevi lovljeni ukazuje na dosta visoko kanalizaciono zagađenje (A2 – van voda za rekreativne aktivnosti - kupanje i sl.), što potvrđuje naše rezultate u embrionalnom razviću ježeva a ukazuje i na visoku senzitivnost ovih organizama na razna zagađenja. Kasnije, lagano povećanje procenta oplođenosti nakon normalizovanja kvaliteta vode ukazuje na kumulativno dejstvo zagađivača i vremena potrebnog za njegovo čišćenje iz organizama.

U Bokotorski zaliv tokom ljetnje sezone ulazi ogroman broj brodova i jahti (sa tendencijom porasta) pa je, zbog nedostatka nautičke kulture i nedovoljnog rada inspekcije, došlo do ispuštanja fekalnih voda i akcidenta na živi svijet ali i na turistički život u tom rejonu.

MIKROBIOLOŠLA ANALIZA MORSKE VODE		
LOKALITET - IBM	broj/100ml	kvalitet vode
20. jul		
ukupne koliforme	580	
fekalne	500	A2
E. coli	500	Izlazi iz voda dozvoljene
Streptokoke	480	za rekreaciju
avgust	sve 0	čista voda
septembar	sve 0	čista voda

Napomena : Podaci su dobijeni od laboratorije za mikrobiologiju IBMK

U narednom periodu primijećeno je povećanje oplođenih jajnih ćelija od 0 – 10 do 60 – 80 procenata (sl. 3).



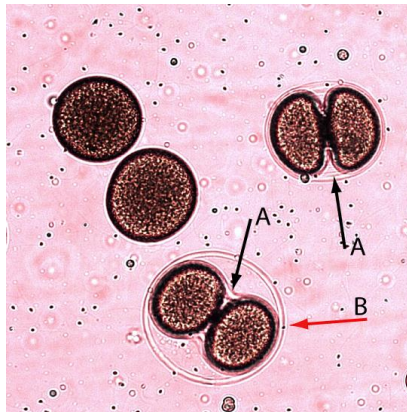
Sl 3. Oplođene jajne ćelije morskog ježa *S. granularis*. U jajnim ćelijama je normalno oplođavanje, vidi se opna oplođenja (pokazano strelicom).

Fig. 3. Fertilized egg cells of sea urchin *S. granularis*. The egg cells of normal fertilization, the fertilization membrane is seen (shown by arrow).

U isto vrijeme kod 30% embriona, kod kojih je primijećena dioba, normalno formiranje opne oplodjenja izostaje ili se vidi nakon završetka prvog dijeljenja (sl.3, desno gore).

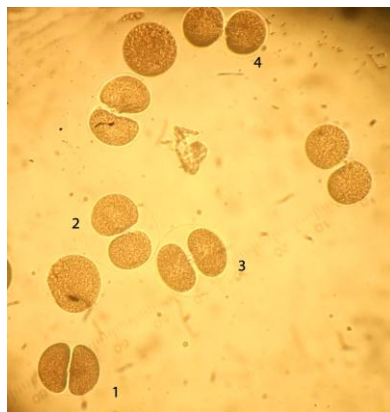
Ovo narušavanje razvika govori o potiskivanju procesa normalne egzocitoze kortikalnih granula u toku reakcije aktivacije koja počinje oplodavanjem, odgovara „prstenastim talasom“ i povećanim nivoom slobodnih jona kalcijuma u primembranskom sloju.

U embrionima u razviću primjećen je veći broj poremećenih dioba, formi blastomera i procesa adhezije blastomera poslije deljenja. U periodu od početka avgusta primjećeno je narušavanje forme jajnih ćelija koje se pojavljuje 25-30 minuta posle oplodjenja, što odgovara početku premještanja citoskeleta i pojavi citokorteksa, recipročno regulisanju serotonergičnih i adrenergičnih mehanizama (Buznikov, Grigorjev, 1990). Takvi embrioni su bili sposobni da pređu diobu, očuvajući narušenu formu blastomere.



Sl. 4. Dioba embriona *S. granularis* A–hijalinski sloj, B–opna oplodjenja
Fig. 4. Embryos division of *S. granularis* A-hyaline layer, V-membrane fertilization

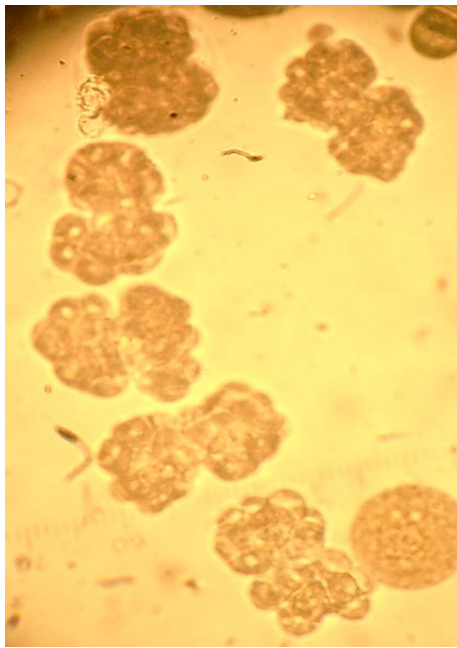
U periodu od 13. jula u velikom broju zapažena je masovna supresija procesa adhezije blastomera poslije djeljenja (“post-division adhesion”, Vacquier, Mazia, 1974). U najvećem broju slučajeva ograničena je na jednom djeljenju, ali u nekim slučajevima zahvata i drugu diobu (sl. 5).



Sl. 5. Blokada adhezije blastomera poslije dijeljenja. Prikazani brojevi označavaju embrione po stepenu blokade (od normalne adhezije 1. do potpuna blokade 4)
Fig. 5. Blockade of adhesion blastomera after division. Numbers indicate the embryos by the level of blockade (from normal adhesion 1 to complete blockade 4)

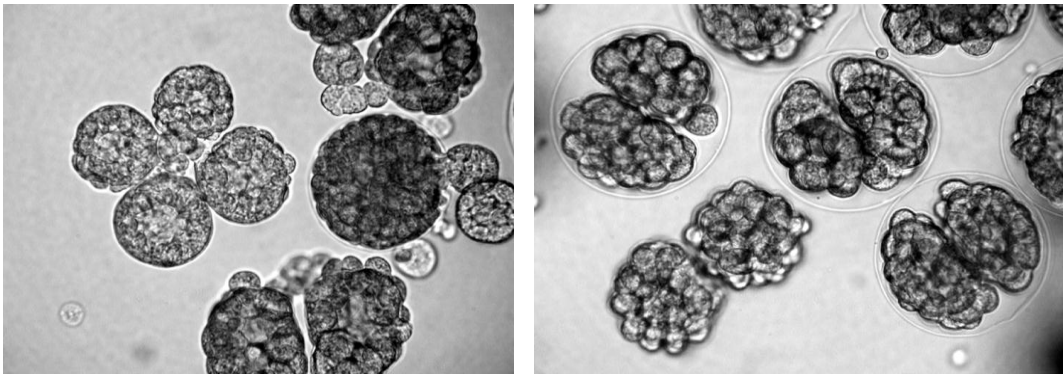
Ovaj tip narušavanja djelimično se vidi pri dejstvu donatora sulfhidrilnih grupa (ditiotreitol, merkaptoetanol, Vacquier, Mazia, 1974) ili blokade unutarćelijskih serotonergičnih procesa (Buznikov, Šmukler, 1978). Isto je i u eksperimentima sa prezasićenošću embriona serotoninom (100 μM). Normalizacija razvoja se ne primjećuje. Najvjerovatnije, blokada adhezije je izazivana nespecifičnim faktorom povrede, moguće jonima teških metala, koji utiču na pokretljivost blastomera poslije završene citokineze.

Shodno tome, pri supresiji adhezije blastomera poslije dijeljenja, na stadijumu rane blastule formirali su se „blizanci“ embriona sa poremećenim razvićem, što potvrđuje supresiju međucelijskog uzajamnog dejstva (sl. 6).



Sl. 6. Formiranje „blizanaca“ na stadijumu rane blastule embriona *S. granularis*
 Fig. 6. Formation of "twins" at an early stage embryo Blastula *S. granularis*

Ovaj fenomen je ranije primijećen od strane saradnika Instituta za biologiju mora na ježevima izlovljenim u Risanskom zalivu (I. Milošević et al. 2007. sl. 7 i 8), a u Kotorskom zalivu ovo je prvi put zabilježeno.



Sl. 7 i 8. Sijamski blizanci (čak i četvorke) uzrokovani djelovanjem žive iz sedimenata Risanskog Zaliva

Fig. 7 and 8. Twins (even four) caused by mercury from sediments of the Bay of Risan

U isto vrijeme, druga komponenta embrionalnih međućelijskih odnosa kod takvih embriona ostaje intaktna. Na takozvanom „mikromernom modelu“ međublastomernih uzajamnih odnosa, pokazano je da tipovi diobe polovine embriona, izolovanih pomoću staklene igle, odgovaraju ranije pokazanim za druge vrste, uključujući *Paracentrotus lividus*, tj. pri izolovanju blastomera prije adhezije. Na četvrtoj diobi u većini slučajeva se formiraju 8 blastomera (3 eksperimenta, 66 izolovanih blastomera iz 82;80%) i samo 20% je formiralo mikromere (16 od 82), a posle adhezije 9 od 46 (19,5%), formiraju rane blastomere, a 81,5% - formiraju mikromere. Blastomere, izolovane od adhezije, očuvale su osjetljivost ka serotoninu (100 μ M) – od embriona koji formiraju mikromere na četvrtoj deobi je porasla na 22% (24 od 40). Ovo odgovara podacima dobijenim ranije, na drugim vrstama morskih ježeva (Šmukler, 1981, 2010), kada je pokazano da se direktna međublastomerna razmjena signala ostvaruje uz prisustvo serotoninских receptora lokalizovanih na ćelijskoj membrani (Shmukler, 1993; Shmukler, Tosti, 2002).

ZAKLJUČAK :

Na osnovu dobijenih rezultata, sa znatnom sigurnošću možemo zaključiti da su u periodu juni – avgust 2010. u akvatorijumu Boke kotorske djelovali polutanti, faktori koji su narušili različite procese ranog razvića morskog ježa *S. granularis*, djelimično oplodavanje, kortikalne reakcije, citokinezu i adheziju blastomera. U principu, pri postojanju odgovarajuće količine hemijskih i farmakoloških preparata, moguće je detaljnije istraživanje mehanizama koji su zahvaćeni ovim zagađenjem. U svakom slučaju, potvrđeno je da rani razvoj morskih ježeva, u datom slučaju *S. granularis*, može da posluži kao pogodan objekat za istraživanje biološki značajnih zagađenja akvatorijuma, koji su, na razne načine, narušili procese ranog razvića morskog ježa.

Embrioni i larve morskog ježa su izvanredan objekat za brzi skrining i detaljne studije neurohemijskih teratogena koji mogu uticati na razvoj mozga sisara i poslužiti kao uspješna alternativa studija neuroteratogenih uticaja pri prenatalnom izlaganju drogama, neurotoksinima i zagađivačima iz spoljašnje sredine.

LITERATURA :

1. G.A. Buznikov B. K. Podmarev: 1974, Morskii eži *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudus* i *S. intermedius*. U knjizi „Objekti biologii razvitiia“, Moskva „Nauka“
2. Buznikov GA. 1990. Neurotransmitters in Embryogenesis. Chur, Switzerland:Harwood Academic Publishers.
3. Buznikov GA, Nikitina LA, Bezuglov VV, Lauder JM, Padilla S, Slotkin TA. 2001. An invertebrate model of the developmental neurotoxicity of insecticides: effects of chlorpyrifos and dieldrin in sea urchin embryos and larvae. Environ Health Perspect 109:651-661.
4. Buznikov G.A., Grigorjev N. G. 1990. Efekt biogenih aminov i ih antagonistov na kortikalni citoplazmatičeski sloi morskih eži. Žurnal evolucione bioh. i fiziol., 26: 614-622
5. Buznikov GA. 1983. Sea urchin embryos as a test system to detect embryotoxicity of chemical compounds. Biol Int 8: 5-8.
6. Vacquier V.D., Mazia D. 1968. Twinning of sand dollar embryos by means of dithiothreitol. The structural basis of blastomere interactions. Exptl. Cell Res., 52, 2., 209-219
7. Бузников Г.А., Шмуклер Ю.Б. 1978. Влияние препаратов-антимедиаторов на межклеточные связи у ранних зародышей морских ежей. Онтогенез, 9, 2, 173-178

8. Milošević I., Buznikov G.A., Nikitina Lj., Lazarević L., Rogač Lj., Gojković M., Bezuglov V., Milošević N., Rakić Lj.: Gameti, rani embrioni i larve morskog ježa kao biosenzori za skrining i detaljne studije uticaja neurotoksikanata i zagađivača životne sredine. «Voda 2007», Tara, 26-29. jun 2007., 281-284
9. Шмуклер Ю.Б. 1981. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. III. Влияние нейрофармакологических препаратов на тип дробления половинных зародышей *Scaphechinus mirabilis*. *Онтогенез*, **12**, 4, 404-409
10. Шмуклер Ю.Б.. 2010. «Микромерная модель» межклеточных взаимодействий у ранних зародышей морских ежей. *Биофизика*, 55, 3, с. 451–459.
11. Šmukler Yu.B., Tosti E.. 2002. Serotonergic-induced ion currents in cleaving sea urchin embryo. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 42, 1, 43-49