

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ РАЗВИТИЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА В ПОПУЛЯЦИЯХ *RANA RIDIBUNDA* PALL. УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2011 Е.В. Спирина, Е.М. Романова, Т.А. Спирина

Ульяновская сельскохозяйственная академия, г. Ульяновск

Поступила 18.09.2009

Проведена оценка состояния *Rana ridibunda* Pall. в популяциях, подверженных антропогенному воздействию разной интенсивности. Состояние особей в популяциях оценивали при помощи морфологического (оценка стабильности развития по уровню флюктуирующей асимметрии) и цитогенетического (микроядерный тест) методов. В популяциях, подверженных воздействию антропогенных факторов, обнаружены нарушения стабильности развития и цитогенетического гомеостаза, свидетельствующие об изменении состояния организма.

Ключевые слова: токсическая нагрузка, защитные функции, антропогенные факторы, загрязнение, антропогенные факторы, средовой стресс, популяция, онтогенез.

Живая природа нашей планеты переживает тяжелый экологический кризис, который начинается на региональном уровне и заканчивается глобальным системным кризисом биосферного уровня.

Для обеспечения устойчивого развития необходима комплексная экспресс оценка экологического состояния окружающей среды, применительно к экосистемам разного уровня сложности. Водная среда является одной из основных сред жизни, а сама вода основным компонентом биосистем, в том числе и тела человека. Современная экология все больше ориентируется на естественные средства диагностики с использованием видов-биоиндикаторов. Биоиндикация позволяет оценить степень и интенсивность воздействия загрязнителей, отражает динамику деградации экосистем в интегральной форме.

Одной из наиболее информативных и интегральных характеристик организма является стабильность его онтогенеза. Стабильность развития – это способность организма к формированию генетически детерминированного фенотипа при минимальном уровне онтогенетических нарушений [1]. Она определяется генетическими факторами и факторами внешней среды.

Мерой стабильности развития может служить флюктуирующая асимметрия, представляющая собой незначительные, ненаправленные отклонения от строгой симметрии [2, 3]. Под влиянием даже слабого негативного воздействия со стороны окружающей среды пути развития организма несколько отклоняются от генетически детерминированной траектории, вследствие чего и возникает флюктуирующая асимметрия. Таким образом, оценка уровня флюктуирующей асимметрии позволяет судить о том, насколько благоприятна среда обитания для данного организма. Преимущество подхода состоит в том, что при этом известна заданная норма, то есть то, что должно

быть при отсутствии возмущающих воздействий, – симметрия.

Другим показателем состояния организма является цитогенетический гомеостаз [4], проявляющийся в поддержании кариотипа. Охарактеризовать цитогенетический гомеостаз можно при помощи микроядерного теста, суть которого состоит в подсчете частоты клеток с микроядрами [5]. Микроядра в основном образуются из хромосомного материала, лишенного центромеры в процессе образования аберраций хромосом и потому отставшего на стадии анафазы от общего числа расходящихся хромосом. В ходе митоза этот материал попадает лишь в одну из дочерних клеток и формирует одно или несколько мелких ядер, так называемых микроядер [6]. Микроядра состоят главным образом из ацентрических фрагментов, что было показано с помощью измерения содержания ДНК [5, 6]. Они могут быть образованы и целой хромосомой в результате не расхождения, вызванного дефектом веретена деления. Микроядра можно наблюдать в клетках любой пролиферирующей ткани [5].

Микроядерный тест довольно широко применяется для оценки действия загрязнителей среды на живые организмы [4]. Микроядерный тест на лабораторных животных стал одним из наиболее практических и кратковременных цитогенетических тестов в токсигенетике [7].

Кроме этого, анализ микроядер представляет большой интерес, так как, он сравнительно прост, быстр и достаточно дешев. К преимуществам микроядерного теста следует отнести не только быстроту, но и независимость от кариотипа исследуемого вида, содержащего иногда большое количество мелких плохо различимых хромосом; кроме того, тестирование можно проводить в тканях с низкой митотической активностью. Выявленная корреляция между результатами микроядерного теста и анализом хромосомных аберраций позволяет считать микроядерный тест хорошим индикатором воздействия различных химических агентов. Сейчас он широко используется для скрининга и мониторинга мутагенов самой

Спирина Елена Владимировна, канд. биол. наук, доцент, e-mail: elspirin@yandex.ru; Романова Елена Михайловна, докт. биол. наук, проф., e-mail: vvr-emr@yandex.ru; Романова Елена Михайловна, соискатель, e-mail: elspirin@yandex.ru.

различной природы, включая и мутагенное воздействие окружающей среды [7].

Цель нашего исследования – оценка стабильности развития природных популяций озерной лягушки (*Rana ridibunda Pall.*), обитающих в р. Свияга и р. Уса с использованием морфогенетического и цитогенетического подходов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в Ульяновской области в 2005-2008 гг. Объектом изучения являлась озерная лягушка (*R. ridibunda Pall.*).

Исследование содержания тяжелых металлов в воде проводилось в 5 точках, вниз по течению р. Свияги: с. Спешневка, с. Стоговка, с. Луговое, г. Ульяновск, с. Лайшевка. В качестве фона был выбран экологически чистый водоток - р. Уса, пробы отбирались в 3 точках: с. Елшанка, с. Михайловка, с. Гавриловка. Степень загрязнения воды тяжелыми металлами определяли в отделе химико-аналитического контроля растениеводческой, пищевой продукции и кормов ФГУ «Станция Агрохимической Службы г. Ульяновска». Анализы проводились атомно-абсорбционным методом. В исследуемых образцах определяли общее содержание таких элементов, как медь, свинец, кадмий, цинк, хром, никель.

Оценку стабильности развития проводили по показателю флуктуирующей асимметрии [7, 8]. Всего было использовано 13 стандартных признаков (число полос и пятен на бедре, голени и стопе, число пятен на спине; число белых островков на вентральной стороне II, III, IV пальцев; число пор на вентральной стороне IV пальца; число зубов на межчелюстной дуге и сошнике). В качестве показателя асимметрии для межпопуляционного сравнения использовалась средняя частота асимметричного проявления на признак (ЧАПП) [7, 8]. Статистическая значимость различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента.

Цитогенетический гомеостаз оценивался по микроядерному тесту [5]. Микроядра учитывали в эритроцитах периферической крови. Для исследования на микроядерный тест были просмотрены по 1-2 препарата от каждой особи. На каждом препарате подсчитывалось число клеток, содержащих микроядра и ядерный материал, не оформленный в четкое микроядро, отнесенное к общему количеству просмотренных клеток. При подсчете клеток учитывались все виды микроядер

и ядерного материала, в соответствии с классификацией Жулевой Л.Ю. и Дубинина Н.П. [9]. Учёт микроядер производили под микроскопом при увеличении *1000. Анализировали по 2000 клеток на препарат. При сравнении частот клеток с микроядрами использовали t-критерий Стьюдента с ф-преобразованием Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химический анализ воды показал, что содержание тяжелых металлов в р. Уса было в пределах ПДК. В р. Свияга содержание тяжелых металлов во всех районах исследования многократно превышало ПДК. Особенно высоким оказалось содержания кадмия, свинца и никеля.

Оценка стабильности развития в популяциях озерной лягушки, обитающих в р. Свияга и в р. Уса дала следующие результаты (рис. 1).

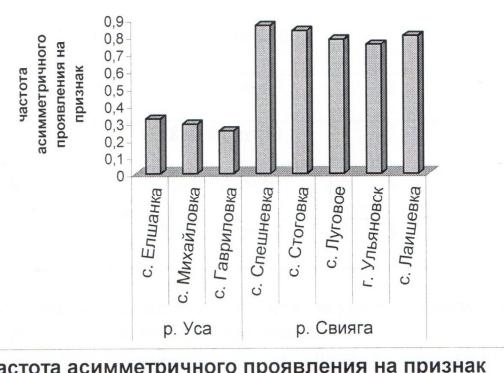


Рис. 1. Показатели морфогенетического гомеостаза в популяциях *R. ridibunda Pall.*

Чтобы ориентировочно оценить степень отклонения состояния организма от нормы, удобно воспользоваться пятибалльной системой оценки [8], где первый балл соответствует условно нормальному, фоновому состоянию популяции, а пятый – критическому.

Наибольшие нарушения стабильности развития были обнаружены у озерных лягушек, отловленных в р. Свияга, они характеризуются пятым баллом, что соответствует критическому состоянию. Среди обследованных выборок наиболее благополучными оказалось состояние популяций из условно контрольного района (р. Уса), они характеризуются первым баллом (условно нормальное состояние) (табл. 1).

Таблица 1. Показатели стабильности развития

Районы исследований	Средняя частота асимметричного проявления на признак	Балльная оценка	Частота встречаемости микроядер, %
р. Уса с. Елшанка	0,32±0,01, n=66	1	0,206
р. Уса с. Михайловка	0,29±0,03 n=64	1	0,203
р. Уса с. Гавриловка	0,25±0,04 n=60	1	0,209
р. Свияга, с. Спешневка	0,86±0,01, n=116	5	0,710
р. Свияга, с. Стоговка	0,83±0,01, n=68	5	0,561
р. Свияга, с. Луговое	0,78±0,01, n=73	5	0,814
р. Свияга, г. Ульяновск	0,75±0,02, n=61	5	0,836
р. Свияга, с. Лайшевка	0,80±0,01, n=83	5	0,878

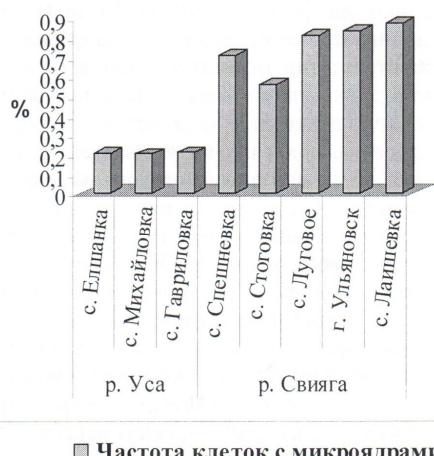


Рис. 2. Частота встречаемости нарушений ядра в популяциях *R. ridibunda* Pall. р. Уса и р. Свияга

Значения показателя асимметрии, полученные для выборок из условно контрольных точек (р. Уса с. Елшанка, с. Гавриловка, с. Михайловка), статистически значимо отличаются от значений, полученных в точках антропогенно-трансформированного водотока ($p < 0,05$). При анализе коэффициентов корреляции средней частоты асимметричного проявления на признак был выявлен сильная связь с содержанием свинца, кад-

мия, и связь средней силы с содержанием никеля и хрома в воде, поэтому использование показателей флюктуирующей асимметрии для оценки стабильности развития озерных лягушек и индикации водотока целесообразно.

Для оценки цитогенетического гомеостаза озерной лягушки использовали микроядерный тест, производили подсчет эритроцитов с микроядрами.

Средняя частота эритроцитов с микроядрами составила: р. Уса, около с. Елшанка – 0,206%, с. Михайловка – 0,203%, с. Гавриловка – 0,209%; р. Свияга, около с. Спешневка – 0,710, с. Стоговка – 0,561%, с. Луговое – 0,814%; р. Свияга на территории г. Ульяновска – 0,836%; р. Свияга, около с. Лайшевка – 0,878%. При проведении микроядерного теста были получены статистически значимые различия между выборками ($p < 0,05$) (рис. 2).

При изучении препаратов периферической крови озерных лягушек, было выявлено, что у лягушек, отловленных в р. Свияга и в р. Уса, наиболее часто встречались клетки с микроядрами вида (а), далее по частоте встречаемости идут клетки с микроядрами вида (б) и (г-II) (табл. 2). Интересно отметить, что почти у каждой лягушки имелись клетки с микроядрами тех или иных видов.

Таблица 2. Доля клеток с микроядрами разных видов у озерных лягушек, отловленных в экологически различных районах

Район исследований	N	Кол-во исследованных клеток		Доля клеток с микроядрами разных видов (%)					
		Всего	Доля с микроядрами, %	а	б	в	г-I	г-II	д
р. Уса с. Елшанка	39	78000	0,206	0,163	0,008	0,015	0,004	0,015	0,001
р. Уса с. Михайловка	37	74000	0,203	0,174	0,004	0	0	0,024	0
р. Уса с. Гавриловка	41	82000	0,209	0,158	0,010	0,017	0,006	0,015	0,002
р. Свияга с. Спешневка	29	58000	0,710	0,417	0,103	0,007	0,050	0,122	0,010
р. Свияга с. Стоговка	27	54000	0,561	0,350	0	0,011	0,033	0,150	0,017
р. Свияга с. Луговое	35	70000	0,814	0,579	0,066	0	0,047	0,097	0,026
р. Свияга г. Ульяновск	37	74000	0,836	0,626	0,035	0,007	0,055	0,093	0,020
р. Свияга с. Лайшевка	34	68000	0,878	0,544	0,146	0,007	0,441	0,116	0,021

По мнению Л.Ю. Жулевой и Н.П. Дубинина [9], наличие в клетках периферической крови озерной лягушки микроядер вида (а) является естественным, тогда как наличие в клетках микроядер других видов является результатом цитогенетического нарушения, произошедшего в организме лягушки под воздействием загрязненности окружающей среды мутагенами. При анализе коэффициентов корреляции микроядер типа (а) была выявлена линейная зависимость от содержания свинца, кадмия, никеля и хрома в воде.

Кроме того, по размерам микроядер можно судить об изменениях, произошедших в хромосомном наборе клеток. Так, появление клеток с крупными микроядрами, в основном связано с нарушениями веретена деления, а появление клеток с мелкими микроядрами вызвано преимущественно структурными аберрациями хромосом. Появление микроядер типа «б» имеет линейную

зависимость с содержанием кадмия, сильную связь с содержанием свинца и хрома, и связь средней силы с содержанием никеля в воде. Наличие микроядер типа «в» свидетельствует о сильной отрицательной связи с содержанием свинца, кадмия, никеля и хрома в воде. Поэтому, в нашем случае можно предположить, что образование клеток с микроядрами вида (б) и (в) коррелирует с нарушениями в структуре хромосом. При анализе коэффициентов корреляции микроядер типа (г-I) была выявлена сильная связь с содержанием в воде свинца, кадмия и хрома и связь средней силы с содержанием никеля. Появление микроядер типа (г-II) свидетельствует о связи средней силы с содержанием свинца, кадмия и хрома в воде. Наличие микроядер типа (д) связано сильной связью с содержанием свинца, кадмия и хрома и связью средней силы с содержанием никеля. Образование клеток с микроядрами

рами вида (г-I), (г-II) и (д) вызвано отставанием хромосом в мета- или анафазе.

При оценке состояния популяций озерных лягушек цитогенетическими и морфогенетическими методами были получены сходные результаты. Наименьшие нарушения по обоим показателям были зафиксированы в выборках из экологически чистого (р. Уса), наибольшие – в выборках из загрязненного (р. Свияга) водотоков (рис. 3).

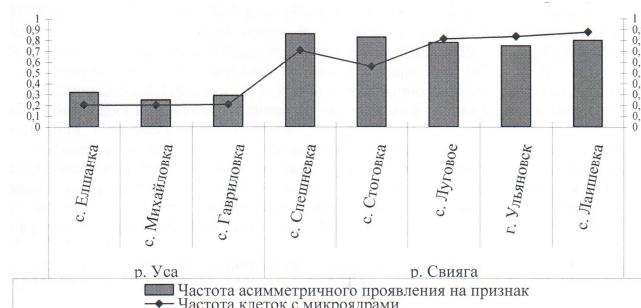


Рис. 3. Сравнение показателей морфогенетического и цитогенетического гомеостаза *R. ridibunda* Pall.

При анализе коэффициентов корреляции клеток с микроядрами, была выявлена линейная зависимость от содержания в воде свинца, кадмия и хрома и сильная связь от содержания никеля в воде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение комплексного подхода, когда состояние организма оценивается не по одному, а по нескольким параметрам (в данном случае по показателям стабильности развития и цитогенетического гомеостаза), позволяет получить более объективную информацию. Следует отметить особенности использованных подходов. Показатели цитогенетического гомеостаза являются отражением физиологической реакции организма на стрессирующий фактор и при его снятии могут вернуться к норме, то есть он отражает благоприятность среды для животного в момент отлова. В то же время оценка стабильности развития по флюктуирующй асимметрии позволяет судить об

условиях, в которых находились животные на ранних стадиях онтогенеза, когда происходило формирование изучаемых признаков, и является неспецифической реакцией организма на стрессирующее воздействие.

Показатель флюктуирующей асимметрии отражает морфогенетический гомеостаз [1]. Микроядерный тест, помимо оценки мутагенной активности, дает возможность судить об уровне цитогенетического гомеостаза [10]. Синхронность изменений обоих этих показателей свидетельствует о том, что каждый из них характеризует общий гомеостаз организма. Это позволяет предположить, что первичная оценка состояния популяции может быть получена при использовании каждого из указанных тестов при экологическом мониторинге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров В.М. Асимметрия животных (популяционно-генетический подход). М.: Наука, 1987. 216 с.
2. Van Valen L. A study of fluctuating fsymmetry. // Evolution, 1962. V. 16. P. 125-142.
3. Захаров В.М. Онтогенез и популяция (стабильность развития и популяционная изменчивость). // Экология, 2001. № 3. С. 164-168.
4. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. 272 с.
5. Evans H.J. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and g-rays on Vicia faba roots and the effects of oxygen. II. Chromosome damage: the production of micronuclei. // Int. J. Radiat. Biol., 1959. V. 3. P. 216-229.
6. Schmid W. The micronucleus test. // Mutat. Res., 1975. V. 31, № 1. P. 9-15.
7. Чубиншиеви А.Т. Гомеостаз развития в популяциях озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall.), обитающих в условиях химического загрязнения в районе Средней Волги // Экология, 1998. Т. 29, № 1. С. 71-74.
8. Чубиншиеви А.Т. Оценка стабильности развития и цитогенетического гомеостаза в популяциях европейских зеленых лягушек (комплекс *Rana esculenta*) в естественных и антропогенных условиях. // Онтогенез, 2001. Т. 32, № 6. С. 434-439.
9. Жукова Л.Ю. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области. // Генетика, 1994. Т. 30, № 7. С. 999-1004.
10. Ильинских Н.Н. и др. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет. Новосибирск: Наука, 1986. 256 с.

EVALUATION OF DEVELOPMENTAL STABILITY AND CYTOGENETIC HOMEOSTASIS IN POPULATIONS OF *RANA RIDIBUNDA* PALL. IN UL'YANOVSK REGION

© 2011 E.V. Spirina, E.M. Romanova, T.A. Spirina

Ul'yanovsk State Agricultural Academy, Ul'yanovsk

The status of *Rana ridibunda* Pall. in populations subjected to anthropogenic influence of various intensity has been evaluated. The status of the specimens in populations was evaluated by morphological (developmental stability as the level of fluctuating asymmetry) and cytogenetic (micronucleus test) methods. Disturbed developmental stability and cytogenetic homeostasis which indicate the changed status of the organism have been observed in populations affected by anthropogenic factors.

Keywords: toxic loading, protective functions, pollution, anthropogenous factors, environmental stress, population, ontogenesis