

УДК 591.111.1, 598.1, 591.52

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ *LACERTA AGILIS L.* ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТРОПОГЕННО НАРУШЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

© 2012 Г.П. Дробот, О.С. Ремизова

Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола

Поступила в редакцию 09.05.2012

В условиях антропогенной нагрузки у ящерицы прыткой показано изменение величин среднего диаметра эритроцитов, частот эритроцитов с микроядрами, структуры лейкоформулы крови. Установлен комплекс показателей для дискриминации особей в зависимости от местообитания.

Ключевые слова: биоиндикация, гематологические показатели, микроядерный тест, лейкограмма, дискриминантный анализ

Все нарастающее неблагоприятное антропогенное воздействие на окружающую природную среду вызывает необходимость постоянного контроля ее здоровья, для оценки которого широко привлекаются биоиндикационные исследования [1]. В качестве биоиндикаторов загрязнения можно использовать рептилий, поскольку они доступны для изучения, обитают у жилья человека, не совершают дальних миграций, характеризуются разнообразным питанием и относительно высоким уровнем метаболизма. Для подобных исследований вполне пригодна оценка сдвигов гематологических показателей, поскольку одной из первых на действие неблагоприятных факторов среды реагирует кровь. Цитологический анализ крови позволяет судить о состоянии организма в различных условиях загрязнения среды обитания [5]. При учете частот эритроцитов с микроядрами (цитогенетический анализ) возможна оценка генотоксичности среды [4].

Цель работы заключалась в проведении морфологического анализа клеток крови ящерицы прыткой (*Lacerta agilis L.*) из биотопов с различной степенью антропогенной нагрузки на территории Республики Марий Эл.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**: 1) провести морфометрические исследования эритроцитов и изучить лейкоцитарный состав крови ящерицы прыткой в зависимости от пола и местообитания; 2) провести дискриминацию особей ящерицы

прыткой по комплексу изученных показателей крови в зависимости от местообитания.

Материалы и методы исследования. Сбор материала проводили в мае 2010 г. Для исследования отлавливали только половозрелых особей ящерицы прыткой. При оценке результатов учитывали местообитание и пол. Животных забирали из различных по антропогенной нагрузке биотопов на территории Республики Марий Эл: 1) ООПТ Государственный природный заповедник «Большая Кокшага» (60 км от г. Йошкар-Олы; «условно чистая» зона) (12 особей); 2) Окраина г. Йошкар-Олы (территория, прилегающая к ЗАО «Мяскомбинат» и заводу «Контакт»; местообитание с повышенной антропогенной нагрузкой) (3 особи); 3) Окраина пгт. Куженер (территория, прилегающая к бывшей военной точке) (8 особей). Территория пгт. Куженер в Государственном докладе за 2010 год охарактеризована как довольно чистая, без превышения ПДК по всем определяемым показателям [2]. Местообитание на данной территории рассматривалось нами как зона с пониженной антропогенной нагрузкой.

Объектом исследования служила кровь ящерицы прыткой (*Lacerta agilis L.*), которую забирали из шейных артерий при декапитации. Мазки крови готовили и окрашивали по стандартным методикам [6]. На гематологических препаратах определяли величину среднего диаметра эритроцитов (СДЭ) при помощи окуляр-микрометра МОВ-1-15Х ГОСТ 7865-5 на 200 эритроцитов у каждой особи. Используя величины диаметров, строили эритроцитометрические кривые Прайс-Джонса [6]. Для других показателей эритроцитов: частота клеток с микроядрами; доли базофильных клеток и клеток с пикнотическими ядрами расчет вели на

Дробот Галина Павловна, кандидат биологических наук, заведующая кафедрой биохимии и физиологии. E-mail: droga59@mail.ru
Ремизова Ольга Сергеевна, студентка. E-mail: lelyanuyannik@mail.ru

1000 эритроцитов у каждой особи. Для определения состава лейкоцитарной формулы учитывая по 100 лейкоцитов у каждой особи. Для статистической обработки данных использовали компьютерные программы STATISTICA 5.5 и Microsoft Excel, проводя однофакторный дисперсионный анализ. Для изучения комплекса параметров прибегали к дискриминантному анализу [8].

Результаты исследования и обсуждение. Величины среднего диаметра эритроцита у ящерицы прыткой представлены в таблице 1.

Таблица 1. Средний диаметр (мкм) эритроцитов ящерицы прыткой

Пол	Местообитание		
	заповедник	г. Йошкар-Ола	пгт. Куженер
♀	10,85±0,01	не отловлены	11,29±0,03
♂	11,21±0,02	11,23±0,02	11,25±0,02

Однофакторный дисперсионный анализ показал значимость фактора местообитание по данному параметру только для самок ($P=0,00665$), поэтому эритроцитометрические кривые построены только для особей данного пола (рис. 1).

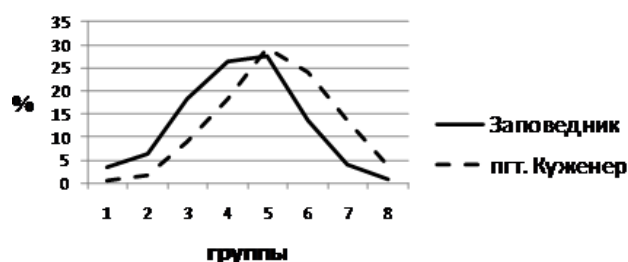


Рис. 1. Кривые Прайс-Джонса для эритроцитов самок ящерицы прыткой

Как видно из рисунка, у кривой Прайс-Джонса для эритроцитов ящериц, обитающих на территории пос. Куженер, выявляется правый сдвиг, что может косвенно свидетельствовать о макроцитозе этих клеток, скрытой анемии и развитии компенсаторных реакций со стороны эритроцитарного ростка. Аналогичная картина отмечена в исследованиях И.З. Хайрутдинова [7], где также показано увеличение размеров эритроцитов прыткой ящерицы, обитающих на трансформированных территориях Татарстана. По мнению автора, такое изменение размеров клеток может свидетельствовать об адаптации в условиях антропогенного воздействия, в виде своеобразной реакции организма в условиях стресса, вызванного внешними факторами.

При определении частот эритроцитов с микроядрами установлена значимость фактора местообитание и у самок ($P=0,000759$) и у самцов

($P=0,001502$). При этом показано, что величина анализируемого параметра у самок, отловленных на территории пгт. Куженер, в 2,3 раза больше, чем таковая у особей из заповедника. У самцов прыткой ящерицы, отловленных на территории заповедника, доля клеток с микроядрами в 1,4 и в 1,8 раза меньше, чем у особей из пгт. Куженер и г. Йошкар-Олы соответственно (рис. 2). Кроме того, фактор пола статистически значим для особей из заповедника ($P=0,00155$), при этом частота эритроцитов с микроядрами у самок ящерицы прыткой в 1,5 раза меньше чем у самцов. Для самцов и самок рептилий из пгт. Куженер по данному показателю различий не выявлено ($P>0,05$).

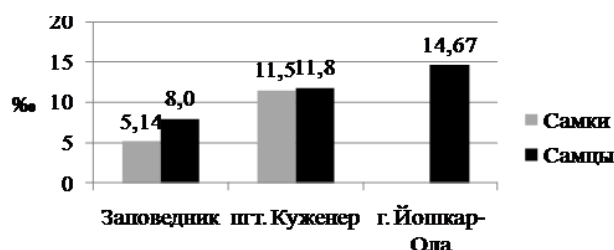


Рис. 2. Частота эритроцитов с микроядрами

По данным А.Ю. Юркина [9] спонтанный уровень клеток с микроядрами у прыткой ящерицы из экологически благополучных районов составляет в среднем $2,8\pm0,5\%$. Довольно высокий уровень этого показателя, обнаруженный нами у ящериц, обитающих в пгт. Куженер ($11,5\pm0,2\%$) и на окраине г. Йошкар-Олы ($14,67\pm0,1\%$), подтверждает наши предположения о неблагоприятной обстановке на исследуемых территориях и может свидетельствовать о токсическом и мутагенном действии среды в указанном местообитании [4].

Особую тревогу вызывает высокий уровень данного показателя у особей ящериц, обитающих на территории ГПЗ «Большая Кокшага», который составил $5,14\pm0,2\%$ у самок и $8,0\pm0,3\%$ у самцов, что приблизительно в 2 и 2,8 раза соответственно выше среднего показателя рептилий из благополучных районов [9]. Аналогичные исследования на эритроцитах ящерицы прыткой из этого же заповедника проводились нами в 2004-2005 гг. В этот период частота встречаемости эритроцитов с микроядрами у ящерицы прыткой соответствовала норме и колебалась в пределах ($2,57\pm0,3\%$) - ($3,15\pm0,2\%$), а у особей, отловленных на окраине г. Йошкар-Олы этот показатель не превышал $6,3\pm0,2\%$ [3]. Высокая частота встречаемости эритроцитов с микроядрами, обнаруженная нами в 2010 г. у рептилий из ГПЗ «Большая Кокшага» и на окраине г. Йошкар-Олы, возможно, свидетельствует об ухудшении качества среды на данных территориях и серьезных

нарушениях в организме ящерицы прыткой или, по крайней мере, о пограничном с этими нарушениями состоянии. Этот факт указывает на необходимость морфологического анализа внутренних органов этих животных. При расчете долей базофильных эритроцитов и клеток с пикнотическими ядрами у особей ящериц из различных биотопов факторы местообитание и пол оказались незначимыми ($P>0,05$).

При анализе лейкоцитарной формулы крови у рептилий, отловленных на территориях заповедника, пгт. Куженер и на окраине

г.Йошкар-Олы, установлено, что в ее структуре преобладают нейтрофилы и лимфоциты, как у самцов, так и у самок (таблица 2). При этом не установлено межполовых различий в долях нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов ($P>0,05$). В то время как для доли базофилов такие различия найдены ($P=0,01671$). Процентное содержание базофилов в крови самок ящерицы прыткой оказалось в 1,2 и 1,4 раза больше, чем у самцов на территории заповедника и пгт. Куженер соответственно.

Таблица 2. Лейкоцитарный состав крови ящерицы прыткой, (%)

ООПТ ГПЗ «Большая Кокшага»	Пол	Нейтрофи- лы (НФ)	Эозинофи- лы (ЭО)	Базофи- лы (БФ)	Моноци- ты (МН)	Лимфо- циты (ЛФ)
«Большая Кокшага»	♀	33,1±0,35	11,0±0,85	12,9±0,94	8,3±0,75	34,7±1,02
	♂	32,9±0,39	13,7±0,92	9,9±0,87	7,7±0,56	35,8±0,98
пгт. Ку- женер	♀	26,5±0,74	10,2±0,86	22,6±1,68	6,6±1,23	34,1±1,06
	♂	28,0±2,47	13,5±1,39	15,3±1,98	8,3±1,90	35,0±2,37
г. Йош- кар-Ола	♂	23,5±0,35	11,8±0,39	15,2±0,8	14,2±0,92	35,3±0,56

При сравнении лейкоцитарных формул самок прыткой ящерицы было выявлено, что фактор местообитания не является статистически значимым для таких показателей как доли нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов ($P>0,05$), но он значим для показателя доля базофилов ($P=0,000005$). Установлено, что доля этих клеток в крови у самок из пгт. Куженер приблизительно в 1,8 раза больше, чем таковая у ящериц из заповедника «Большая Кокшага» (таблица 2). При сравнении лейкоцитарных формул самцов в зависимости от их местообитания значимых различий для определяемых долей клеток нами не выявлено ($P>0,05$).

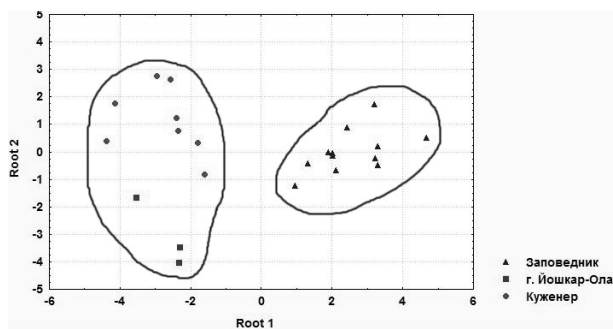


Рис. 3. Диаграмма рассеяния особей ящерицы прыткой обоего пола из различных местообитаний

В ходе дискриминантного анализа нами установлено, что различие (дискриминация) особей из трех местообитаний с разной степенью антропогенной нагрузки статистически высоко значимо (статистика Уилкса Лямбда=0,038;

$F(18;24)$; $P<10^{-4}$) (рис. 3). При оценке вклада каждого показателя в дискриминацию особей из разных местообитаний было установлено, что это разделение проведено по трем показателям: частота эритроцитов с микроядрами (статистика Уилкса Лямбда=0,084567; $F(7,378)$; $P=0,008138$), доля нейтрофилов (статистика Уилкса Лямбда=0,065958; $F(4,434)$; $P=0,036154$), доля моноцитов (статистика Уилкса Лямбда=0,078857; $F(6,4746)$; $P=0,012380$).

Анализ величин коэффициентов канонических функций показал, что первая дискриминантная функция определяется, главным образом, показателями: частота встречаемости эритроцитов с микроядрами и доля нейтрофилов, вторая дискриминантная функция – показателем доля моноцитов в лейкоцитарной формуле. На диаграмме рассеяния видно, что первая дискриминантная функция разделяет особей ящерицы прыткой с территории заповедника от рептилий из местообитаний г.Йошкар-Ола и пгт. Куженер. Таким образом, особи ящерицы прыткой, отловленные на ООПТ заповедника, отличаются по ряду изученных признаков от рептилий, обитающих на антропогенно измененных территориях.

Выводы:

1. У особей ящерицы прыткой (*Lacerta agilis* L.), обитающих на ООПТ ГПЗ «Большая Кокшага», установлены межполовые различия по среднему диаметру эритроцитов и доле клеток с микроядрами, величины которых значительно больше у самцов, чем у самок.

2. У самок ящерицы прыткой в отличие от самцов, обитающих на территории пгт. Куженер, установлен макроцитоз эритроцитов, что косвенно свидетельствует о скрытой анемии у этих животных.

3. Во всех изученных местообитаниях у особей ящерицы прыткой обнаружена высокая частота абберантных эритроцитов, что может свидетельствовать о повышенной генотоксической нагрузке на этих территориях.

4. Межполовые различия по лейкоцитарному составу крови установлены только у особей ящерицы прыткой, обитающих на территории пгт. Куженер, где у самок доля базофилов больше, чем у самцов, и является максимальной в лейкоформуле крови по сравнению с рептилиями из других изученных местообитаний.

5. Дискриминация особей ящерицы прыткой в изученных местообитаниях может быть проведена по следующим показателям крови: доля эритроцитов с микроядрами, процентное содержание нейтрофилов в лейкоформуле.

6. Проведенное исследование подтвердило возможность использования ящериц в качестве организмов-биоиндикаторов для оценки здоровья среды и показало успешное применение для этих целей крови рептилий и комплекса выбранных нами гематологических показателей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Темплан НИР ФГБОУ ВПО «Марийский государственный университет» на 2010-2012 гг.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ашихмина, Т.Я. Биоиндикация и биотестирование: методы познания экологического состояния окружающей среды. – Киров: ВятГГУ, 2005. Вып. 4, ч. 3. 51 с.
2. Государственный доклад о состоянии окружающей природной среды Республики Марий Эл в 2009 году. – Йошкар-Ола: Экологический центр Республики Марий Эл, 2010. 132 с.
3. Дробот, Г.П. Особенности гематологических показателей некоторых видов амфибий и рептилий, обитающих на урбанизированной территории / Д.П. Дробот, Л.И. Губайдуллина, А.Л. Жулева и др. // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: сб. материалов всероссийской науч. конф. 27 янв.-1 фев. 2008 г. – Йошкар-Ола, 2008. С. 414-415.
4. Жулева, Л.Ю. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области / Л.Ю. Жулева, Н.П. Дубинин // Генетика. 1994. Т.30. №7. С. 999-1004.
5. Козлова, С.А. Исследование морфологии эритроцитов как показатель оценки влияния на организм факторов окружающей среды // Актуальные проблемы экологии. 2004. Т.3. №5. С. 396.
6. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. 364 с.
7. Хайрутдинов, И.З. Экология рептилий урбанизированных территорий (на примере г. Казани): автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.З. Хайрутдинов. – Казань, 2010. 25 с.
8. Юнкеров, В.М. Математико-статистическая обработка, данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – СПб.: ВМедА, 2002. 266 с.
9. Юркин, А.Ю. Методические особенности анализа микроядер в клетках человека и животных при экологической оценке состояния окружающей среды: автореф. дис. канд. мед. наук. – Томск, 2002. 22 с.

USING THE HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF *LACERTA AGILIS* L. FOR ESTIMATING THE ANTHROPOGENICALLY DISTURBED TERRITORIES

© 2012 G.P. Drobot, O.S. Remizova

Mari State University, Yoshkar-Ola

Under conditions of anthropogenic impact *Lacerta agilis* L. have shown variation in the average diameter of erythrocytes, frequencies of erythrocytes with micronuclei, structure of differential leucocytes formula. Established the complex of indicators for discrimination the individuals, depending on habitat.

Key words: *bioindication, hematological indicators, micronucleus test, leucogram, discriminant analysis*