

Уважаемые коллеги вашему вниманию предлагается доклад, в рамках исследования проблем адаптации организма и популяции к радиоактивному загрязнению среды обитания.

Радиоактивное загрязнение окружающей среды, возникшее в результате крупных аварий на объектах ядерного топливного цикла, стало в настоящее время одним из важных экологически значимых факторов. По мере накопления информации о биологических эффектах малых доз радиации на первый план выступает проблема адаптации организма и популяции к радиоактивному загрязнению среды обитания и расшифровка механизмов, ее осуществляющих. Это необходимо для конкретной оценки опасности для всего живого - изменения уровня радиационной нагрузки на биосферу (О генетических процессах..., 1972; Ильенко и др., 1974; Ильенко, Крапивко, 1986; Ильенко, Крапивко, 1989; Шевченко и др., 1993; Васильев и др., 1996; Васильев, Васильева, 2000; Наследуемая хромосомная..., 1996; Барабой, 1996; Биохимические механизмы..., 1997; Гилева и др., 2000; Новые материалы..., 2002; Позолотина, 2003; Григоркина, Пашнина, 2007; Современное состояние..., 2008).

Анализируя литературные данные, касающиеся проблем адаптации, мы столкнулись с многообразием критериев, с позиций которых рассматривается данное явление, в том числе – термодинамических (Бауэр, 1935; Аршавский, 1982; Пригожин, Стенгерс, 1986; Зотин, Зотин, 1999), эволюционных (Северцов, 1967; Тимофеев-Ресовский, 1969; Большаков, 1972; Майер, 1972; Шварц, 1980; Шмальгаузен, 1983) и физиологических (Слоним, 1971; Селье, 1972; Анохин, 1975; Меерсон, 1981; Казначеев, 1980; Кулинский, Ольховский, 1992).

В физиологических критериях адаптация – совокупность физиологических реакций на клеточном, тканевом, системно-органным уровнях, лежащих в основе приспособления организма к изменению условий окружающей среды и направленных на сохранение

относительного постоянства его внутренней среды – гомеостаза. В эволюционном понимании, адаптацию относят к категории приобретаемых в процессе онто- и филогенеза наследуемых свойств организма, которые обеспечивают не только существование биологической совокупности (популяции, вида,..) в определенных условиях окружающей среды, но и процесс прогрессивной эволюции.

Классификация адаптаций на генотипические и фенотипические позволяет учитывать природу приспособительных изменений в онто- и филогенезе (Симпсон, 1948; Тимофеев-Ресовский, 1977; Озернюк, Нечаев, 2002): 1- генотипические, базирующиеся на мутационных изменениях, формирующих новый генотип; 2 - фенотипические, основанные на функционально-метаболической коррекции физиологического состояния в пределах возможностей исходного генотипа.

Приспособления первой категории, базирующиеся на мутационных изменениях, формирующих новый генотип, развиваются на протяжении множества поколений, обуславливают преобразование генофонда популяции, связаны с естественным отбором и имеют эволюционную значимость в формировании новых видов. Поэтому к ним нередко применяется термин популяционно-видовых (Шкорбатов, 1971) или, пользуясь терминологией Н.М. Любашевского (2009), популяционно-генетических адаптаций.

Фенотипические адаптации, составляют основу быстро протекающих физиологических реакций в организме в ответ на изменение того или иного фактора среды (акклимации по В.В. Хлебовичу, 1981), реализуются на протяжении одного жизненного цикла в рамках нормы реакции вида и имеют обратимый характер. Поэтому к ним нередко применяется термин индивидуальных (Меерсон, 1981), физиологических (Казначеев, 1980) или онтогенетических адаптаций (Озернюк, 1992).

В настоящее время обсуждается возможность наследования фенотипических изменений, посредством эпигенетических механизмов, не путем геномных и хромосомных мутаций, а за счет передачи потомкам информации о функциональном состоянии генетических программ активности какого-либо гена или совокупности генов после воздействия модифицирующих факторов (Мазурик, Михайлов, 1999; Зайнуллин, Таскаев, 2005). Нарушение нормального течения процессов репрессии-дерепрессии определенных локусов генома способствует закреплению на уровне генетической регуляции физиологических, биохимических и цитологических изменений в организме (Аккоев, 1988). На исследуемых нами участках ВУРСа популяции мелких грызунов подвергаются радиационному воздействию более 50 лет, что обуславливает возможность формирования качественно новых популяций как результат генетических и/или эпигенетических преобразований.

В экологическом понимании Актуальность исследования физиологической (=индивидуальной, =онтогенетической) адаптации организма животных к радиационной среде определяется необходимостью оценки благополучия популяции с точки зрения продолжительности и качества жизни индивидуума. Изучение генотипической природы радиоадаптации дает возможность решить проблему видообразования, сопутствующего совершенствованию приспособлений к радиационному фактору среды.

(слайд2) Цель работы: ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У МАЛОЙ ЛЕСНОЙ МЫШИ НА ТЕРРИТОРИИ ВУРСа

Задачи:

- 1. Изучение особенностей метаболического гомеостаза у животных зоны ВУРСа для характеристики механизмов резистентности и определения стратегии физиологической адаптации к радиоактивной среде.**
- 2. Исследование зависимости показателей метаболического гомеостаза от времени содержания в виварии животных для определения генотипической или фенотипической составляющей адаптационного процесса при радионуклидном загрязнении среды обитания.**

(слайд3) Объект исследования –малая лесная мышь -активно мигрирующий наземный вид с обширным ареалом: от Восточной Европы и Турции на западе до юга Западной Сибири, Алтая и Северо-Восточного Китая на востоке. На севере ареал проходит по Юго-Восточной Эстонии, северным частям Вологодской области, Среднему Уралу и Зауралью, среднему Прииртышью (Громов, Ербаева, 1995; Пантелеев, 1998; Челомина, 2005).

(слайд4) В фауне мелких грызунов территории ВУРСа малая лесная мышь является доминирующим видом: доля ее отлова в выборках разных лет составляет 40-60 % (Популяции млекопитающих..., 1993; Мелкие млекопитающие..., 2007).

Относится к числу стронциефоров (Ильенко, Крапивко, 1989), однако, из-за потребления семенного корма, обладает более слабым концентрированием поллютантов и радионуклидов, по сравнению с землеройками и полевками (Карагезян, 1987; Мухачева, 1996; Стариченко, 2004).

Средняя концентрация ^{90}Sr в костной ткани зверьков, отловленных на участке ВУРСа в 13 км от эпицентра Кыштымской аварии, с уровнем загрязнения почвы по ^{90}Sr 6740–16690 кБк/м², составляет, по данным В.И. Стариченко (2004) 161 ± 29 Бк/г сырой кости, по данным О.В. Тарасова (2000) – 140 ± 25 Бк/г.

Мощность дозы от ^{90}Sr составляет 2.51 мГр/сут (Популяционная феногенетика..., 2003), поглощенная доза на костный мозг - от 7 до 50 сГр в течение жизни (Новые материалы..., 2002).

(слайд5) На данном слайде изображена карта-схема района исследований. Дистанция между участками отлова составляет по прямой порядка 8 км. Контрольный участок отлова находится за пределами ВУРСа: уровень загрязнения почвы по стронцию-90 как основного источника загрязнения составляет 43.7 кБк/м². Опытный участок отлова располагается в 13 км от эпицентра аварии. Уровень загрязнения почвы по стронцию-90 варьирует от 6740 до 16690. Гамма-фон превышает контрольный уровень в среднем в 4 раза.

Исследовали непополовозрелых сеголеток: самцов и самок второго типа онтогенеза (2 ФФГ). Общее количество зверьков для проведения экспериментальных работ 82 особи, контрольного участка отлова -45 зверьков, опытного – 37.

(слайд6) Проводили биохимические методы исследования для характеристики энергетических аспектов резистентности: а именно, углеводного, липидного обмена в тканях печени, надпочечниках, плазме и эритроцитах периферической крови, уровня цитохромоксидазной активности митохондрий и состояния их про-антиоксидантного баланса.

Структурные аспекты резистентности анализировались посредством состояния белкового обмена и функциональной активности генома – расчет отношения ДНК/общий белок, РНК/ДНК.

(слайд7) Для сравнения показателей животных контрольной и загрязненной радионуклидами территорий использовали

ковариационный анализ. Удобством этого метода является повышение эффективности анализа межгруппового фактора, в данном исследовании – радиационного, путем учета и устранения эффектов сопутствующих переменных (ковариат), влияющих на показатели. В качестве ковариат использовали год отлова, пол зверьков, время содержания животных в виварии.

В ИТОГЕ ИСПОЛЬЗОВАНЫ скорректированные средние, которые получаются после удаления всех различий, обусловленных влиянием ковариат.

Выбор этих сопутствующих переменных основан на анализе литературных данных, указывающих на межгодовую изменчивость параметров гомеостаза диких грызунов, изменение их физиологического состояния при лабораторном содержании, возрастные и половые особенности метаболизма (Покровский, Большаков, 1979; Эндокринные и метаболические..., 1986; Чернявский и др., 2003; Биологические эффекты..., 2004; Ковальчук, Ястребов, 2003).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ липидного и углеводного обмена указывает на повышение их уровней у животных территории ВУРСа, что можно рассматривать как механизм поддержания энергообеспечения возросшей клеточно-тканевой функциональной активности.

(слайд8) В частности, в ткани печени и надпочечниках животных ВУРСа выявлено увеличение концентрации, как общих липидов, так и вторичных продуктов их перекисного окисления (МДА).

С учетом специфики выполняемых функций повышение показателей в печени отражает взаимообусловленное усиление в гепатоцитах процессов утилизации жирных кислот, освобожденных в процессе липолиза жировой ткани организма, и их последующей трансформации по перекисному механизму при активном участии

митохондриальных и микросомальных структур клетки (Гепатоцит..., 1985; Mortensen, 1980; Fawcett, 1981; Osmundsen et al., 1991).

Повышение уровня липидов в печени является показателем хронического стресса, наблюдается в период высокой численности особей и трофической напряженности в популяции. Отмечено для грызунов из зон радиационного неблагополучия. Средняя величина концентрации общих липидов в печени у животных ВУРСа не достигает критических значений (более 160 мг/г сух. массы), позволяющих судить о развитии жировой дистрофии гепатоцитов, связанной с накоплением в клетках липидных капель, вследствие их избыточного поступления из жировой ткани и/или блокады утилизации в функционирующих органах (Черкасова, Мережинский, 1961; Клочков, 1970; Авцын, Шахламов, 1979). Высокая доля грызунов с жировой дистрофией отмечена для «чернобыльской» популяции. По данным Материй с соавт (2003), доля особей с жировой дистрофией печени, отловленных из зоны Чернобыльской АЭС составляла, в зависимости от года исследования, от 47.2 до 100 %. Возможно, что более низкие дозовые нагрузки у лесных мышей территории ВУРСа, по сравнению с «чернобыльскими» животными, обуславливают отсутствие явно выраженных патологических расстройств.

Надпочечники являются местом утилизации и трансформации липидов в качестве предшественников кортикостероидных гормонов – минероло- и глюкокортикоидов, принимающих участие в регуляции углеводно-липидного баланса в организме путем активации липолиза жировой ткани и глюконеогенеза в печени (Биохимия гормонов..., 1976; Horber, Haymond, 1990; Timothy, 1996). Более высокая, относительно контроля, концентрация МДА указывает на интенсификацию гидроксилирования липидов как основного механизма синтеза стероидных гормонов (Nakamura et al., 1966; Ланкин, 1981). Повышенная концентрация общих липидов характеризует хроническое действие на ткани надпочечников адренкортикотропных гормонов гипофиза,

которые, помимо индукции стероидогенеза, оказывают трофический эффект, связанный со стимуляцией внутриклеточных систем биосинтеза липидов, или усилением их утилизации из циркуляторного русла крови.

(слайд9) В плазме периферической крови, как результирующей метаболических процессов в организме, отмечено повышение уровня общих липидов, более выраженное – возрастание холестерина, незначительность активации ПОЛ, снижение отношения белок/липид. Выявленные изменения свидетельствуют об увеличении в циркуляторном русле липопротеидов с преобладанием атерогенной фракции (ЛПНП и ЛПОНП), отличающейся высоким содержанием в своей структуре трудноокисляемых холестерина и триглицеридов и низким содержанием – белка (Климов, 1977; Журавлев, 1991). Следует отметить, что концентрация общих липидов и холестерина в крови животных из зоны ВУРСа не достигает критических значений (для липидов больше 400 мг%, для общего холестерина более 100 мг%), позволяющих судить о развитии липидемии как определяющего фактора атеросклеротических изменений (утолщение и уплотнение стенок сосудов, связанных с отложением жиров и холестерина).

(слайд10) Сравнение показателей углеводного обмена позволило выявить две особенности:

- более выраженный, чем в контроле расход глюкозы в качестве источника энергии, направленность метаболизма на восполнение запасов углеводных резервов в организме, что подтверждается активацией гликолиза в эритроцитах, снижением уровня глюкозы плазмы крови, отсутствием изменений в содержании гликогена печени.

Второй момент рассматривается как важное звено адаптации организма при хроническом стрессе, обеспечивающее сохранение энергетического потенциала тканей и органов (Панин, 1978; Калашникова, Фадеева, 2006). Следует отметить, что средняя величина концентрации

глюкозы в крови у животных из зоны ВУРСа не достигает критических значений (меньше 70 мг%), позволяющих судить о развитии гипогликемического синдрома (Телушкин и др., 2008), связанного с нарушением обменных процессов в организме .

В целом, изменения в липидном и углеводном обмене характеризуют активацию стероидогенной функции надпочечников, гликогенсинтезирующей и секреторной – печени, связанной с процессами глюконеогенеза и синтезом липоротейдов, транспортной – плазмы крови, кислород-транспортной - эритроцитов и говорят о вовлечении в ответную реакцию организма стресс-реализующей гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы как результата хронического стрессирующего воздействия условий ВУРСа

(слайд11) У животных территории ВУРСа повышена активность цитохромоксидазы митохондрий, что указывает на активацию окислительных энергообразующих процессов. Повышение про-антиоксидантного отношения характеризуют инициацию перекисьобразования и стимуляцию процесса β -окисления жирных кислот, что можно рассматривать как следствие преимущественного использования более энергоемких субстратов (липидов и сукцината). Возможно, что высокий уровень функциональной нагрузки на митохондрии, сопровождающийся оксидативными процессами являются достаточными для нарушения компактности структуры митохондриальных мембран, усиления их проницаемости, что и определяет снижение содержания белков митохондриальной фракции клеток.

(слайд12) Исследование состояния белкового обмена у лесной мыши региона ВУРСа характеризует в целом его анаболическую направленность - за счет роста содержания общего белка печени (+17), головного мозга (+17 %), надпочечников (+ 52 %) и миокарда (+ 9 %). Снижение уровня белков (- 49.5 %) отмечено в селезенке - как

результата активации катаболизма имеющихся белковых структур или снижения исходного уровня митотической активности спленоцитов, что характерно для стресса, в том числе и радиационного (Регуляция энергетического..., 1978; Зимин, 1979; Панин, 1983; Горизонтов и др., 1983; Федотов, Поздняков, 1986; Жербин, Чухловин, 1989; Барабой и др., 1992; Наумов, 1998). С учетом всех наблюдаемых изменений процент прироста белковой компоненты тканей относительно невелик и составляет в итоге 14 % к контролю, что существенно меньше уровня активации аэробных энергообразующих реакций (слайд13). Это определяет преимущественный расход энергии в клетке в русле «специализированного – функционального», а не «пластического» обмена и характерно для истощающей, а не умеренной работы физиологических систем (Шапот, 1952).

(слайд14) У малой лесной мыши территории ВУРСа установлено более низкое отношение ДНК/общий белок и более высокое РНК/ДНК в ткани печени и селезенке (рис. 4.5), что указывает на ограничение аутокаталитической функции генома к редупликации ДНК и повышение гетерокаталитической активности, связанной с синтезом РНК и процессами дифференцировки.

Поскольку селезенка является примером ткани «иерархичного» типа организации пролиферации, то такие изменения указывают на уменьшение в ткани относительной доли делящихся клеток и увеличение - дифференцированных форм. В качестве объяснения можно предположить задержку деления стволовых клеток и с соответствующим удлинением их митотического цикла, прежде всего периода G_1 , что обуславливает индукцию дифференцировки и, как следствие, увеличение пула созревающих и конечных функционирующих форм (Исследование клеточных...1964; Акоев, 1988). В ткани печени, представленной дифференцированными клетками, сохраняющими способность к пролиферации, снижение способности клеток к синтезу

ДНК связано с переключения ядерных и цитоплазматических структур клетки на синтез специфических белков (Исследование клеточных..., 1964; Конюхов, 1973), что подтверждается в наших исследованиях ростом отношения РНК/ДНК в ткани. Необходимой предпосылкой ограничения пролиферативных потенций клеток может служить выполнение некоторых тканеспецифических функций, таких как утилизация липидов, синтез их транспортных форм (Бродский, Урываева, 1981), что отразилось в наблюдаемом нами повышении уровня липидного обмена.

Наличие в ткани более зрелых, высокодифференцированных, форм клеток регистрируется (слайд15) также по снижению относительной доли ядерного, митохондриального белка, на фоне увеличения содержания белка постмитохондриальной фракции клеток.

В целом, все наблюдаемые изменения можно рассматривать как признаки «репликативного старения» тканей, подразумевающих переключение клеточного метаболизма в режим, несовместимый с репликацией ДНК, снижение способности клеток к репродукции и рост дифференцировочных потенций (Гаврилов, Гаврилова, 1978).

Известно, что развитие предпатологических и патологических состояний в той или иной форме связано с изменением нормального соотношения процессов клеточного размножения и дифференцировки (Акоев, Мотлоха, 1984). Существует мнение (Wangenheim, 1976; Ярилин, 1989; 1999; Боровицкая и др., 1990; Волчков, 1992), что малые дозы радиации, активирующие процессы репарации ДНК, действуют как индуктор дифференцировки, что определяет более быстрое прохождение клеток по жизненному циклу, и как следствие, их старение преждевременную гибель по типу апоптоза - естественно завершающего этапа клеточного цикла (Kerr et al., 1972; Уманский, 1982; Хаитов и др., 2006). С этих позиций обнаруженные нами изменения в

функционировании генома у малой лесной мыши можно рассматривать как признаки радиационно-индуцированного клеточного старения.

(слайд16) Исследование зависимости метаболических показателей от времени содержания животных в виварии показало статистически незначимые стандартизированные коэффициенты β регрессии для животных контрольной территории, что свидетельствует о стабильности исходного уровня гомеостаза как результата эволюционно сформировавшейся нормы реакции на обитание в природной среде. Напротив, содержание лесных мышей в виварии, отловленных на территории ВУРСа, привело к изменению показателей, что характеризует отсутствие стабильности гомеостаза, сформированного под влиянием радиационной среды.

Все исследованные показатели через 40 – 50 суток содержания в виварии возвращаются к контрольным значениям **(слайд17)**. К определяющим факторам динамики наблюдаемых изменений следует отнести установленное снижение на 75 % суммарной бета-активности в организме мелких грызунов ВУРСа через три недели содержания в виварии (Стариченко, Любашевский, 1998).

Следовательно, обратимость ответной реакции метаболического гомеостаза характеризует фенотипическую адаптацию малой лесной мыши к радионуклидному загрязнению среды ВУРСа, формирующую индивидуальную радиорезистентность, и отсутствие генотипической, закрепленной в поколениях, адаптации как основы становления популяционной радиорезистентности и формирования качественно новых популяций животных.

Предположение, что метаболические изменения в организме малой лесной мыши региона ВУРСа наследственно не закреплены, высказывается в работе (Устинова, Рябинин, 2005). Не выявлено также особенностей аллозимной структуры популяции малой лесной мыши из зоны ВУРСа,

которые бы принципиально выделяли их из ряда других популяций Урала (Модоров, 2009).

Несмотря на возможность сходства наблюдаемых последствий Кыштымской аварии с последствиями Чернобыльской катастрофы, и локального загрязнения территорий в Республике Коми, где наблюдалось наследование функционально-метаболических и морфо-физиологических отклонений, нужно учитывать некоторые особенности региона ВУРСа. Они связаны с небольшими поперечными размерами загрязненной зоны (Григоркина, Оленев, 2004), что определяет временную оседлость активно мигрирующих грызунов на ВУРСе.

К определяющим факторам генетически незакрепленных механизмов радиорезистентности малой лесной мыши к среде ВУРСа следует отнести- возможность миграции на незагрязненную территорию, что обуславливает возврат к исходному фенотипу как более оптимальной, при отсутствии радиационного фактора, формы взаимодействия организма и среды.

(слайд18) Заключение

Установлено, что обитание малой лесной мыши территории ВУРСа вызывает изменения в метаболизме, соответствующие хронической форме неспецифической адаптационной реакции, обуславливающей, посредством мобилизации стресс-реализующей гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, поддержание, прежде всего, повышенных уровней энергетического гомеостаза и клеточно-тканевой функциональной активности.

В процессе адаптации малой лесной мыши к условиям ВУРСа имеет место недостаточность энергообеспечения пластического роста тканей, что характерно для истощающей, а не умеренной работы физиологических систем. Снижение способности клеток к репродукции на фоне роста дифференцировочных потенций можно рассматривать как признаки радиационно-индуцированного клеточного и тканевого

старения, ведущего к сокращению продолжительности жизни особей в среде обитания ВУРСа.

Таким образом, более высокий, чем в контроле, уровень энергозатрат на функционирование и ускоренные темпы старения организма являются своеобразной мерой морфофункциональной «платы» за реализацию адаптации в неблагоприятных условиях ВУРСа.

Обратимость ответной метаболической реакции *Apodemus (S) uralensis* характеризует фенотипическую адаптацию данного вида к радионуклидному загрязнению среды ВУРСа, формирующую индивидуальную радиорезистентность, и отсутствие генотипической, закрепленной в поколениях, адаптации как основы формирования качественно новых субпопуляций животных.