

Доклад

Биохимические исследования метаболизма, наряду с широко применяемыми морфофизиологическими, фено- и цитогенетическими методами, характеризуются высокой чувствительностью к выявлению сдвигов в экосистеме, в первую очередь наиболее ранних (Большаков и др., 1984; Ковальчук, Ястребов, 2003). В качестве модельных объектов в мониторинге уровня загрязнения окружающей среды, ее качества и пригодности для хозяйственной деятельности и проживания человека часто используются мелкие млекопитающие как составляющие экосистемы в силу своего систематического положения, трофического статуса, высокой степени воспроизводства и низкой продолжительности жизненного цикла (Захаров, Кларк, 1993; Криволицкий и др., 1998; Васильев, Васильева, 2000). Уникальным полигоном для радиоэкологических исследований является Восточно-Уральский радиоактивный след, образовавшийся в 1957 г. в результате взрыва емкости с отходами ПО «Маяк». Особый интерес к популяциям млекопитающих, обитающих на этой территории, обусловлен необходимостью выявления механизмов, позволяющих им успешно обитать в условиях загрязнения, а также установлением всего многообразия биологических эффектов.

(слайд1) Цель работы: изучить особенности метаболического гомеостаза в популяциях трех видов мелких грызунов разной экологической специализации, определяющие стратегии физиологической адаптации к радионуклидному загрязнению среды обитания.

Задачи исследования:

1. Изучить исходный уровень метаболических процессов в организмах трех видов мелких грызунов – малой лесной мыши, красной полевки, обыкновенной слепушонки, обитающих на контрольных фоновых участках вне зоны радиоактивного загрязнения.

2. Определить особенности метаболических реакций изучаемых видов грызунов на обитание в зоне ВУРСа.
3. Оценить значимость исходного уровня метаболических процессов в формировании адаптационной стратегии организмов к хроническому облучению.
4. Выявить взаимосвязь метаболических изменений с концентрацией ^{90}Sr в костной ткани, полом животных, годом их отлова, временем содержания в виварии.

Материал и методы:

Отловы мелких грызунов проводились на четырех стационарных участках (слайд3), расположенных в зоне ВУРСа и сопредельных к ней территориях. По литературным данным к 1991 г. загрязнение территории ВУРСа на 99.3 % обусловлено ^{90}Sr (Заключение комиссии..., 1991). Для мышей и полевок опытный участок отлова располагался в 13 км от эпицентра аварии с уровнем загрязнения почвы по стронцию-90 до $17\text{Мбк}\backslash\text{м}^2$. Гамма-фон превышает контрольный уровень в среднем в 4 раза. Для слепушонок опытный участок отлова располагался в 6 км от эпицентра аварии с уровнем загрязнения почвы по стронцию-90 до $40\text{Мбк}\backslash\text{м}^2$ и гамма-фоном в 30 раз превышающим контрольный уровень.

Однородность выборки по возрастному и репродуктивному статусу сформировали, используя функционально-онтогенетический подход, и представили непополовозрелыми сеголетками.

Исследования проведены на трех видах мелких грызунов(слайд4): малая лесная мышь (*Apodemus (S.) uralensis* Pall., 1811), красная полевка (*Clethrionomys (Cl.) rutilus* Pall., 1779), обыкновенная слепушонка (*Ellobius (E.) talpinus* Pall., 1770), отличающихся разной экологической специализацией. Имеются видовые особенности(слайд5-7) в биотопической приуроченности, пищевой специализации, интенсивности терморегуляции, климато-географическом распространении, жизненной форме, репродуктивной активности и

продолжительность жизни, а также особенности в поведенческих реакциях и социальной организации. Малая лесная мышь и красная полевка – активно мигрирующие наземные виды грызунов, с высокими темпами полового созревания, репродукции и относительно низкой продолжительностью жизни, отличаются ареалом обитания, биотопической приуроченностью, пищевыми предпочтениями, интенсивностью химической терморегуляции. Обыкновенная слепушонка – малоподвижный вид, отличающийся посемейной организацией поселений, специализированный к подземнорующему образу жизни, с низкими темпами полового созревания, репродукции и высокой продолжительностью жизни. Предпочитает открытые, слабоувлажненные участки, богатых подземной фитомассой, имеет слабо выраженную терморегуляцию и гибернацию в зимний период (Наумов, 1963; Большаков, 1972; Суточная активность..., 1976; Башенина, 1977; Летицкая, 1984; Садыков, 1984; Колчева, 1992; Евдокимов, 2001).

Радиоэкологическая характеристика представлена различиями по радиочувствительности видов, а также различиями по концентрации ^{90}Sr в костной ткани животных, обитающих на территории ВУРСа, что опубликовано рядом исследователей.

Для оценки метаболического гомеостаза использовали биохимические методы исследования. Определяли показатели трех типов обмена: углеводного, липидного, белкового (слайд 8-9)

Основные показатели – содержание гликогена печени, концентрация глюкозы в плазме крови, активность глюкозофосфатизомеразы в эритроцитах периферической крови; концентрация общих липидов и продуктов их перекисного окисления, а также содержание общего белка в печени, надпочечниках, миокарде, плазме периферической крови, селезенке, головном мозге.

Проводили оценку энергообразующих и про- антиоксидантных процессов в митохондриях печени, миокарда и головного мозга на

основании активности цитохромоксидазы, каталазы, содержания малонового диальдегида;

Учитывали состояние функциональной активности генома клеток - на основании отношений ДНК/общий белок и РНК/ДНК в печени и селезенке.

– кислород-транспортной функции эритроцитов - по содержанию в них гемоглобина и метгемоглобина, с учетом численности в периферической крови

Основные результаты проведенных исследований представлены (слайд10)

- различиями в исходном уровне биохимических показателей у трех видов животных, обитающих на контрольных фоновых участках вне зоны радиоактивного загрязнения;

- особенностями метаболических реакций у трех изучаемых видов грызунов на обитание в радиоактивной среде;

- взаимосвязью метаболических изменений с концентрацией ^{90}Sr в костной ткани, полом животных, годом их отлова

Исходное состояние метаболических процессов в организмах грызунов разной экологической специализации можно рассматривать как результат эволюционно сформировавшейся адаптации к специфическим условиям среды их обитания, в то же время является вектором гомеостатических реакций при воздействии новых возмущающих факторов (Большаков, 1972; Слоним, 1979; Большаков и др., 1984; Ковальчук, Ястребов, 2003; Мазина, 2005). С этой целью был проведен сравнительный анализ исходного уровня биохимических показателей у трех видов, обитающих на контрольных фоновых участках вне зоны радиоактивного загрязнения. Для наглядности представления полученных различий показатели выражены в стандартизированных величинах (слайд11)

Красная полевка среди трех изучаемых видов отличается наиболее низким уровнем углеводных и липидных резервов организма (по цифрой 1,2), что обусловлено их интенсивным использованием в окислительном метаболизме тканей, судя по концентрации МДА в тканях и активности глюкозофосфатизомеразы в эритроцитах. Повышенное, относительно других видов, содержание в периферической крови гемоглобина и численности эритроцитов свидетельствует о высокой кислородной емкости крови, а сниженный уровень метгемоглобина в эритроцитах является, согласно данным литературы (Блюменфельд, 1957; Крайнев, 1970), показателем высокого парциального давления кислорода в клетках крови. Это определяет более высокий, относительно других видов, уровень кислородного обеспечения тканей. При низком содержании общих белков в тканях наши исследования определяют энергозатратные механизмы приспособительных реакций в естественной среде обитания, направленные, прежде всего на высокую функциональную активность клеток и тканей. Выявленные особенности метаболизма у красной полевки как вида, приуроченного к обитанию в лесной, лесотундровой и тундровой зонах Северной Евразии, можно рассматривать как результат эволюционно сформировавшейся, адаптации к экстремальным природным факторам в условиях Севера. К числу общих закономерностей физиологической адаптации к таким условиям относят высокий уровень клеточно-тканевой функциональной активности и минимизация энергозатрат на пластические процессы (Слоним, 1971; Казначеев, 1980; Панин, 1983; Большаков и др., 1984; Ковальчук, Ястребов, 2003).

Особенности метаболического гомеостаза обыкновенной слепушонки, выражены в повышенном уровне углеводных и липидных резервов в организме, в сниженном их потреблении в окислительном метаболизме, в более низком уровне кислородного обеспечения тканей. Это является характеристикой низкого уровня обменных процессов и

функциональной активности, что обусловлено в первую очередь подземно-колониальным образом жизни и адаптированностью к аридным зонам.

Минимизация энергозатрат и функций к этим условиям связано с резким ограничением водного баланса и процессов терморегуляции (McNab, 1966; Слоним, 1979), а высокий уровень метаболических резервов определяется необходимостью выхода из гибернации и обеспечения роющей деятельности (Большаков и др., 1982а; Евдокимов, 2001; Новиков, 2007).

Малая лесная мышь по уровню метаболических резервов, интенсивности окислительных процессов в тканях и их кислородного обеспечения занимает промежуточное положение между красной полевкой и малой лесной мышью. Вероятно, это связано с меньшим уровнем энергозатрат на функциональную активность, по сравнению с красной полевкой, в связи с приуроченностью к обитанию в более комфортных климато-географических юго-западных условиях, и более высоким уровнем энергозатрат относительно обыкновенной слепушонки в связи с активным наземным образом жизни. Характеристикой гомеостаза является более высокое, чем у красной полевки, содержание общего белка в тканях, что определяет высокий уровень пластических, белок-синтезирующих, процессов. Очевидно, что для данного вида характерен преимущественный вклад энергии в пластические процессы, а не в функциональную активность (как у красной полевки), что отмечено для грызунов с приуроченностью к обитанию в южных горных экосистемах (Большаков и др., 1984).

Как показывают наши исследования, исходные особенности метаболизма у каждого из изучаемых видов грызунов являются базисом для приспособительных перестроек гомеостаза в условиях радионуклидного загрязнения.

Рассмотрим особенности метаболических реакций грызунов, на обитание в зоне ВУРСа

Малая лесная мышь как доминирующий вид в фауне мелких грызунов территории ВУРСа послужила основным объектом исследования метаболического гомеостаза.

Установлена более низкая концентрация глюкозы в плазме крови, более высокая активность глюкозофосфатизомеразы в эритроцитах при постоянном уровне гликогена печени (слайд12). Результаты показывают более выраженный, чем в контроле, расход глюкозы в тканях в качестве источника энергии для функциональной активации, а также направленность метаболизма на восстановление запасов углеводных резервов (глюконеогенез). Такие изменения в организме животных характерны для хронического стресса и направлены на сохранение энергетического потенциала тканей и органов при длительном воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды (Mayer, Rosen, 1977; Панин, 1978; Калашникова, Фадеева, 2006).

Установлено (слайд13) увеличение концентрации общих липидов в печени, надпочечниках, плазме крови, снижение – в миокарде, что, при более выраженной интенсификации перекисного окисления липидов, указывает на возрастание доли липидов в окислительном метаболизме тканей и активацию метаболических функций (стероидогенной – надпочечников, липопротеидсинтезирующей – печени, сократительная – миокарда, транспортной – плазмы крови).

Выявлено повышение активности цитохромоксидазы в митохондриях печени, головного мозга, миокарда (слайд14), указывающее на повышение уровня энергопродукции, взаимообусловленного функциональной активацией.

Белковый обмен характеризуется незначительным повышением содержания общего белка в печени, миокарде, головном мозге и

надпочечниках (слайд15), что существенно меньше уровня активации окислительных энергообразующих процессов в митохондриях. Это определяет преимущественный расход энергии на функциональную активность, а не пластические, белок-синтезирующие, процессы и свидетельствует о напряженной работе физиологических систем. Снижение содержания общего белка в селезенке может быть следствием активации катаболизма имеющихся белковых структур или снижения исходного уровня митотической активности спленоцитов, что характерно для стресса, в том числе и радиационного.

Как результат повышенного режима функционирования клеток имеет место изменения в функциональной активности генома клеток - снижение отношения ДНК/общий белок и увеличение РНК/ДНК в печени и селезенке (слайд16), что свидетельствуют об ограничении доли пролиферирующих и возрастании доли дифференцированных клеток в тканях.

В целом, метаболические сдвиги соответствуют стресс-реализующей стратегии физиологической адаптации, которая обеспечивает активацию окислительного метаболизма, рост энергообразующих процессов и повышение режима функционирования клеток и тканей в неблагоприятных условиях среды обитания. Наличие потенциала для функциональной активации определяется исходно высоким содержанием митохондриальных и общих белков в тканях, а также достаточным уровнем метаболических резервов в виде гликогена и липидов печени.

Результаты указывают, что в целом, реакция самцов на обитание в зоне ВУРСа более выражена, чем у самок, на данном слайде представлена графически по результатам факторного анализа (слайд17) (рис.), учитывающего изменчивость по комплексу параметров.

Исследуя взаимосвязь метаболических показателей и года отлова животных (слайд18) было установлено, что группа животных региона

ВУРСа в годы высокой численности (2005, 2006) выделилась в отдельный, наиболее отдаленный, кластер, как результат суммарного стрессирующего воздействия на популяцию радиационного фактора и экологического, вызванного высокой численностью. Это подразумевает увеличение чувствительности популяции зоны ВУРСа к дополнительным, неблагоприятным воздействиям факторов среды.

У красной полевки, ответная реакция, в отличие от реакции малой лесной мыши, направлена на ограничение доли липидов в окислительном метаболизме тканей (слайд19) и снижение уровня энергообразующих процессов в митохондриях (слайд20). Отмечена стимуляция белок-синтезирующих процессов (слайд21). А увеличение отношения ДНК/белок в печени и селезенке при менее выраженных изменениях РНК/ДНК характеризует увеличение доли пролиферирующих и уменьшение доли дифференцированных клеток в тканях (слайд22).

Установленные изменения определяют гипобиотическую стратегию физиологической адаптации красной полевки к условиям ВУРСа, направленную на снижение уровня окислительного метаболизма и энергозатрат на функциональную активность и обеспечивающая рост пластических процессов. Стратегия формируется на базе исходно высокой напряженности функционирования клеточно-тканевых систем и недостаточности метаболических резервов в организме.

Обыкновенная слепушонка отличается гетерогенностью уровня и направленности изменений метаболического гомеостаза на основании существенного увеличения стандартных отклонений средних значений большинства показателей (слайд23). Гистограмма распределения некоторых показателей графически иллюстрирует гетерогенность реакции особей данного вида на радиационное воздействие (слайд24).

К факторам, определяющим гетерогенность метаболических изменений, следует отнести установленную В.И. Стариченко широкую вариабельность в уровне накопления ^{90}Sr в костной ткани животных. У исследованных нами слепушонок из эпицентра ВУРСа, принадлежавших 4 семьям, выявлены значимые ($p < 0.01$) межсемейные различия в накоплении ^{90}Sr . На слайде помечены желтым цветом (слайд25). Благодаря опубликованным данным была представлена возможность проанализировать взаимосвязь метаболических изменений у слепушонок из зоны ВУРСа с уровнем накопления стронция-90.

По показателям липидного обмена (слайд26) при концентрации ^{90}Sr 627 ± 26 и 847 ± 66 Бк\г установлено повышение вклада липидов в окислительный метаболизм, при концентрации ^{90}Sr 1269 ± 27 и 1411 ± 77 Бк\г - ограничение участия липидов в окислительных процессах.

По показателям углеводного и белкового обмена:

в более низком диапазоне концентраций ^{90}Sr выявлена недостаточность пластических, белок-синтезирующих, процессов в тканях вследствие ограниченного вклада углеводных резервов в окислительный метаболизм (слайд27). При более высоких концентрациях радионуклида в костной ткани наблюдается рост белок-синтезирующих процессов на фоне усиления расхода углеводных резервов.

В целом, метаболические реакции у обыкновенной слепушонки характеризуют при более низких концентрациях радионуклида стресс-реализующую стратегию адаптации, направленную на увеличение вклада липидов в окислительный метаболизм, рост кислородного обеспечения тканей как базисов функциональной активации; при более высоких концентрациях радионуклида - гипобиотическую стратегию с ограничением вклада липидов в энергетическую продукцию с направленностью на

активацию белок-синтезирующих процессов на фоне усиления расхода углеводных резервов.

Таким образом, к определяющим факторам формирования стратегий следует отнести как уровень накопления в костной ткани радионуклидов, определяющего степень давления на организм радиационного фактора; так и исходное состояние метаболизма, сформировавшееся в процессе эволюционного развития и экологической специализации видов к естественной среде обитания.

При сравнении степени выраженности ответной реакции красной полевки и малой лесной мыши методом дискриминантного анализа выявлено более выраженное преобразование гомеостатических систем под воздействием радиокулидного загрязнения у красной полевки (слайд28). К определяющим факторам можно отнести более высокую, в 3-4 раза по сравнению с малой лесной мышью, концентрацию стронция-90 в костной ткани красной полевки из зоны ВУРСа как показателя более высокой силы повреждающего воздействия. Разнонаправленность ответной метаболической реакции в процессе приспособления организма красной полевки и малой лесной мыши к радиационному фактору приводит к уменьшению исходных межвидовых различий. Однако наибольший кластер, где объединяются 2 вида вне зависимости от среды обитания, указывает на то, что уровень радионуклидной нагрузки недостаточен для нивелирования сформированных в процессе эволюции видовых особенностей гомеостаза.

Для сравнения уровней ответной реакции на длительное облучение трех видов грызунов был проведен кластерный анализ (слайд29). Учитывая гетерогенность метаболических изменений у обыкновенной слепушонки, зависящей от уровня накопления ^{90}Sr в костной ткани животных, выборка из зоны ВУРСа была разбита на четыре группы. Кластерный анализ показал меньшую выраженность ответной реакции обыкновенной слепушонки, несмотря на более

высокую, относительно двух других видов, концентрацию радионуклида в костной ткани. Меньшая выраженность изменений у обыкновенной слепушонки была показана также по комплексу цитогенетических, гематологических и иммунологических показателей, что авторы рассматривают во взаимосвязи с эколого-физиологическими особенностями вида – полной оседлостью в зоне ВУРСа, радиозащитным эффектом меланина или же эффектом перекрестной адаптации к хроническому облучению и условиям гипоксической гипоксии в связи с подземным образом жизни (Новые материалы..., 2002; Гилева, 2002; Большаков и др., 2003; Григоркина, Пашнина, 2007; Любашевский, Стариченко, 2009).

Заключение можно резюмировать в трех положениях (слайд30) и в целом отметить, что высокая чувствительность метаболических реакций и их неоднородность в условиях хронического облучения у разных биологических видов и отдельных организмов в пределах одного вида обосновывает необходимость биохимического анализа метаболизма в решении как фундаментальных проблем адаптации к антропогенным воздействиям, так и при разработке принципов и практических мер защиты окружающей среды и здоровья человека. Благодарю за внимание.