

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ И ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА СЕГОЛЕТОК *RANA ARVALIS NILSS.* В УСЛОВИЯХ УРБАНИЗАЦИИ

© 2001 г. В. Л. Вершинин, И. Н. Камкина

Институт экологии растений и животных УрО РАН
620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

Поступила в редакцию 29.08.99 г.

На протяжении трех лет в начальный период наземной жизни изучали митотическую активность и размеры клеток эпителия роговицы сеголеток *Rana arvalis* из популяций, подверженных разному уровню антропогенного воздействия на территории г. Екатеринбурга. Выявлены слабая положительная связь митотической активности с индексом печени, косвенно отражающим уровень обменных процессов в организме сеголеток. Наиболее информативно использование показателя пролиферативной активности в сочетании с размерами клеток эпителия и относительным весом печени. Отмечено наличие зависимости между митотическим индексом и индексом печени у сеголеток из популяций с наиболее антропогенным трансформированным территорий, что свидетельствует о высокой степени сбалансированности процессов морфогенеза и, по-видимому, может способствовать снижению вероятности появления морфологических аномалий в нестабильных условиях среды. Возможно, эта физиологическая особенность дает возможность популяциям существовать и воспроизводиться на урбанизированной территории.

Ключевые слова: амфибии, остромордая лягушка, пролиферативная активность, морфофизиология, морфогенез.

Особенности биологии амфибий, развитие которых с момента оплодотворения протекает в водной среде вне материнского организма, обуславливают значительную зависимость этой систематической группы от условий окружающей среды и ее состояния. Особи с различными морфологическими отклонениями практически всегда встречаются в популяциях земноводных (Borkin, Palkovits, 1986; Hebard, Brunson, 1963; Talvi, 1993). Известно множество примеров, когда возникновение уродств индуцируется такими побочными следствиями человеческой деятельности, как разного рода поллютанты. В основном все аномалии распадаются на две большие группы – наследственные и приобретенные в ходе регенеративных и онтогенетических процессов. Аномалии, возникающие в результате сбоев развития и атипичной регенерации, во многом определяются ингибированием или активацией поллютантами тиреоидной функции, что ведет к подавлению пролиферативных и формообразовательных процессов при развитии личинок амфибий и регенерации органов (Сюзюмова, 1985), а также влияет на уровень обменных процессов (Токарь и др., 1991).

Цитологические показатели отражают физиологическое состояние организма и являются ре-

зультатом его взаимодействия со средой обитания. Митотическая активность тканей – один из показателей уровня общей активности организма и его физиологического состояния (Соколов, Кузнецова, 1978). Известна видовая и географическая специфика уровня митотической активности у земноводных (Гаттигуллина, 1978). Исследовано влияние на митотическую активность гормональных факторов (Doumpon, Chibon, 1974), в основном гормонов щитовидной железы.

Развитие амфибий, включая метаморфоз, представляет собой упорядоченную последовательность событий. Отчасти эта последовательность обусловлена нарастанием активности щитовидной железы и чувствительности различных систем организма к выделяемым гормонам. Процессы морфогенеза и регенерации в организме ориентированы на гипофизарно-тиреоидную ось (Fischman, 1996; Menon et al., 1996). Катализм тиреоидных гормонов осуществляется главным образом в печени и почках. Тироксин у гомойотермных животных оказывает калоригенное действие, связанное с увеличением потребления кислорода большинством тканей организма. Холоднокровные животные по существу не чувствительны к калоригеному действию тиреоидных гормонов (Gorbman, Bern, 1962). У головастиков амфибий до метамор-

фоза введение гормонов щитовидной железы не вызывает изменений в потреблении кислорода. У взрослых *Rana piroiens* потребление кислорода существенно возрастает (Warren, 1940), а при содержании животных при температуре выше 13°C наблюдается снижение веса тела.

Интенсивность обмена веществ может быть оценена прямыми физиологическими методами, основанными на учете потребления кислорода, либо косвенными, морфофункциональными, с помощью определения индекса печени и цитогенетическими – по уровню митотической активности тканей.

Нами была предпринята попытка применить метод оценки пролиферативной активности тканей в практике экологических исследований, посвященных специфике популяционных процессов в современной биоте в сочетании с рядом иных показателей, что позволяет судить о значимости изменений, происходящих на клеточном уровне у особей из популяций, подвергающихся различным типам антропогенных воздействий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Настоящая работа основывается на материалах, полученных в результате изучения естественных популяций амфибий городской черты. В зависимости от уровня антропогенного воздействия мы выделяем в пределах крупного промышленного города четыре зоны, к которым приурочены места обитания земноводных. В основу разделения на зоны положена степень интенсивности жилой застройки (этажность, плотность и другие особенности застройки, освоенность территории человеком, также учитывается уровень загрязнения): I зона – центральная часть города с многоэтажной застройкой, массивными асфальтовыми покрытиями, водосёками с промышленным загрязнением, мелкими реками и ручьями, забраными в трубы; II зона – районы многоэтажной застройки с осваиваемыми территориями, примыкающие к центральной части города; III зона – малоэтажная застройка, главным образом дома частного сектора с садами и огородами, окраины города, пустыри, парки, нередко биотопы этой зоны смыкаются с лесопарками; IV зона – лесопарковый пояс города. В качестве контроля была выбрана популяция, населяющая участок леса в 23 км от г. Екатеринбурга. Премлемость настоящей типализации для подобного рода исследований подтверждена данными гидрохимических анализов основных пересточных водоемов из мест обитания, находящихся под наблюдением. В каждой из зон находится несколько популяций амфибий. Объектом исследований служила широко встречающаяся в городской черте и окрестностях Екатеринбурга

остромордая лягушка (*Rana arvalis* Nilss.). Материал для цитогенетических исследований в городской черте собран в 1995–1997 гг. Параллельно с полевым материалом в 1997 г. были получены данные по митотической активности на сеголетках остромордой лягушки, выведенных из икры тех же полупарий в лабораторных условиях.

Цитогенетический анализ выполнен на роговой оболочке глаза. Эпителиальная ткань роговицы наиболее удобна для цитогенетических анализов, поскольку она представляет собой бессосудистую систему, метаболиты поступают в клетки равномерно через базальную мембрану. Эпителий роговицы выполняет защитную функцию, находясь в непосредственном контакте с поллютантами, присутствующими в окружающей среде. Протоплазматический рост в таких тканях можно измерить путем подсчета делящихся клеток на единицу площади эпителия роговицы в популяции животных или в определенной выборке из нее (Бергт, 1968).

В качестве фиксатора использовали жидкость Карни (Кальюсте, 1968; Лили, 1969). Тотальные препараты готовили по стандартной методике (Елифанова, 1965) и окрашивали гематоксилином по Бемеру (Роскин, Левинсон, 1957). При исследовании тканевого роста определяли клеточную плотность, подсчитывая число клеток в поле зрения микроскопа, ограниченного прямоугольной диафрагмой площадью 3025 мкм², затем находили среднюю величину эпителиальной клетки в мкм². На тех же препаратах определяли митотическую активность (МА). В роговице подсчитывали число митозов в 50 полях зрения (поле зрения равно 3025 мкм²) при общем увеличении 1350. Просмотр препаратов проводили с применением иммерсионного объектива (окуляр 10×, объектив 90×) по двум взаимно перпендикулярным диаметрам в микроскопе системы Биолам Д.13. Значения митотического индекса (МИ) выражены в промилле (число митозов на тысячу клеток).

Кроме цитологических показателей, использовали морфофункциональные индексы сердца и печени (Шварц и др., 1968). Анализировали наличие регressive зависимостей между митотическим индексом и данными параметрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных выявил значительные межгодовые и межпопуляционные различия, обусловленные как спецификой конкретного года, так и особенностями среды мест обитания. В 1995 г. наибольшая частота митозов отмечена у сеголеток *R. arvalis* ($F = 11.84, p < 0.01$) из популяций лесопарковой зоны. Популяции зоны многоэтажной застройки и контроля значимо не различи-

Таблица 1. Значения митотической активности эпителия роговицы сеголеток (1995–1997 гг.)

	1995 г.	Зона	N	L, мм	МА	МИ, %	S, мкм ²	
1996 г.	II	43	17.5 ± 0.27	21.7 ± 0.96	7.61 ± 0.5	74.29 ± 0.79		
		III			Нет данных			
		IV	22	15.9 ± 0.36	27.5 ± 2.68	9.96 ± 0.7	73.95 ± 1.87	
	Контроль	28	15.0 ± 0.23	22.3 ± 1.54	7.82 ± 0.6	74.3 ± 1.34		
		II	11	16.6 ± 0.18	35.7 ± 2.3	10.1 ± 0.68	59.3 ± 0.66	
	III				Нет данных			
1997 г. (природа)		IV	30	16.4 ± 0.16	24.9 ± 1.36	7.27 ± 0.41	61.6 ± 0.35	
		Контроль	21	14.3 ± 0.15	21.2 ± 1.49	6.55 ± 0.43	65.6 ± 0.46	
		II	46	15.8 ± 0.28	22.2 ± 2.3	6.8 ± 0.71	65.0 ± 1.29	
III	23	14.1 ± 0.42	16.5 ± 1.54	5.47 ± 0.52	69.9 ± 1.0			
	IV	63	15.0 ± 0.22	24.9 ± 1.54	7.99 ± 0.51	67.5 ± 0.73		
Контроль	18	15.3 ± 0.45	15.4 ± 1.9	4.97 ± 0.57	69.5 ± 1.25			
	1997 г. (эксперимент)		II	28	13.6 ± 0.24	8.1 ± 0.82	3.06 ± 0.31	79.3 ± 0.58
III	11	13.5 ± 0.32	12.36 ± 2.1	4.58 ± 0.8	78.0 ± 0.78			
	IV	13	12.8 ± 0.59	12.4 ± 1.56	4.52 ± 0.54	77.0 ± 0.83		
Контроль	18	13.8 ± 0.37	11.2 ± 1.8	4.15 ± 0.68	78.4 ± 1.7			

Примечание. S – площадь клеток, MA – число митозов в 50 полях зрения.

чались по этому показателю. В 1996 г. наблюдается рост митотического индекса с увеличением уровня урбанизации местообитаний (6.7; 7.3; 10.1%). В 1997 г. у животных из популяций с городской территорией МИ также был выше, чем в контроле (табл. 1), что, вероятно, связано с более высокими среднемессячными температурами в местообитаниях городской черты (Вершинин, 1997).

Известно, что средняя температура воздуха в центральной части крупных городов на 1–2°C выше, чем на окраинах (Одум, 1975). Аналогично обстоит дело с температурным режимом водоемов в г. Екатеринбурге (Вершинин, 1983, 1997). Во II и III зонах майские среднемессячные температуры нерестовых водоемов достоверно выше примерно на 3°C ($p < 0.0001$), чем в IV зоне и за городом, а пределы минимальных значений больше на 0.5–1°C (табл. 2). Показана зависимость митотической активности эпителия роговицы от температуры, плотности личиночных поселений и ряда других факторов (Ли, 1963; Downton, Chibon, 1974; Гатильтуллина, 1975, 1978; Слюзомова, 1985). Отмечено, что снижение температуры ведет к сокращению количества митозов (у сеголеток остромордой лягушки в 1.5 раза), а развитие личинок в условиях высокой плотности способствует росту митотической активности (до 1.9 раза).

Данные по митотическому индексу сеголеток остромордой лягушки, развивавшихся в лабораторных условиях (1997 г.) при стабильной температуре 20°C, отличаются от полевых данных того же года – наименьший МИ у животных из популяций зоны многоэтажной застройки (см. табл. 1) и в эксперименте его значения всегда ниже.

При анализе регрессий митотического индекса с массой и индексом печени установлено, что в данных за 1995 г. в полевом материале есть достоверная слабая связь – $R = 0.258$ ($p = 0.012$) между индексом печени и МИ сеголеток из популяций II зоны, в 1996 г. – $R = 0.317$ ($p = 0.0127$), в 1997 г. –

Таблица 2. Среднемессячные температуры начальных этапов развития амфибий в зонах с разным уровнем урбанизации (суммарно за 1980–1997 гг.)

Зона	Температура, °C		N
	средняя	пределы колебаний	
II	15.33 ± 0.39	4.5–28.5	155
III	14.05 ± 0.47	5.0–27.0	96
V	11.09 ± 0.38	4.0–28.0	180
K	12.39 ± 0.52	4.0–28.0	91

Таблица 3. Встречаемость морфологических аномалий у сеголеток *R. arvalis* (1995–1997 гг.), %

Зона	Половой материал								Эксперимент	
	1995 г.	N	1996 г.	N	1997 г.	N	Суммарно	N	1997 г.	N
II	23.4	158	18.2	11	4.44	90	16.6	259	0	60
III		Нет данных			6.52	92	6.52	92	23.3	30
IV	3.03	33	7.5	40	7.14	252	6.7	325	6.67	30
K	1.59	126	0	32	0	56	0.94	214	0	30

$R = 0.295$ ($p = 0.046$), а на лабораторном материале такая связь установлена у сеголеток III зоны ($R = 0.73$; $p = 0.011$) и контрольной популяции ($R = 0.67$; $p = 0.0022$).

В экспериментальных условиях (1997 г.) значимая связь МИ отмечена только с массой печени у сеголеток из загородной популяции — $R = 0.68$ ($p = 0.00186$), а также у животных зоны II — $R = 0.369$ ($p = 0.05$).

При объединении полевых данных за все годы по каждой из зон между МИ и индексом печени у животных из зоны многоэтажной застройки отмечается слабая, но высокодостоверная связь ($R = 0.31$; $p = 0.0014$), тогда как между МИ и массой печени нет значимой связи ($R = 0.191$; $p = 0.0057$). По данным 1997 г. у полевых и экспериментальных животных из популяций зоны II митотический индекс отличается от выборок из других зон ($p = 0.05$; $p = 0.0087$). В целом картина зональных изменений значений митотического индекса весьма сходна, за исключением животных зоны многоэтажной застройки из полевых выборок, где этот показатель больше, чем в зоне малозатяжной застройки и контроле. Это, скорее всего, связано с селективной элиминацией в естественных условиях особей с низким уровнем обменных процессов и соответственно сниженным МИ (Пястолова, Вершинин, 1999).

Итак, в течение всего периода наблюдений у сеголеток III зоны отмечается слабая, но значимая линейная зависимость между митотическим индексом и индексом печени (p изменяется в пределах 0.0012–0.046).

Сравнение средней площади клеток роговицы не выявило зональных различий в размерах эпителиальных клеток *R. arvalis*, метаморфизировавших в 1995 г. Это может быть связано с завершением метаморфоза в условиях сильного сокращения размеров водоемов и высокой плотности личиночных поселений в результате засушливого лета, что способствовало нивелированию различий.

Размеры клеток эпителия роговицы сеголеток из разных по степени урбанизации зон в 1996 г. значимо ($F = 3.64$, $p = 0.015$) отличаются (см. табл. 1).

В популяциях *R. arvalis*, подверженных наибольшему антропогенному воздействию, отмечены самые мелкие клетки (65.2 мкм^2 — контроль, 61.5 мкм^2 — лесопарковая зона, 59.6 мкм^2 — зона II). В 1997 г. размеры клеток у сеголеток из популяций II зоны также были мелкими ($F = 3.55$; $p = 0.016$) в отличие от экспериментальных животных, у которых клетки были незначительно крупнее, чем в других зонах (см. табл. 1). Вероятно, это связано с интенсивным ростом животных в популяциях зоны многоэтажной застройки — здесь сеголетки, как правило, достигают наибольших размеров тела (Вершинин, 1983). Сеголетки городских популяций имеют крупные размеры тела и более мелкие клетки, чем сеголетки из контрольной популяции. Размеры клеток у сеголеток *R. arvalis* в зонах с разным уровнем урбанизации значимо не отличались, но (в сравнении с загородными популяциями) в популяциях II зоны они мельче. Ранее в лабораторных исследованиях не отмечалось зависимости между размерами тела и клеток эпителия (Гатиятуллина, 1978).

Известно, что в условиях городской среды отмечается рост частоты различных морфологических аномалий (Вершинин, 1982, 1989; Vershinin 1995), причем максимальных значений она достигает в популяциях зоны многоэтажной застройки, т.е. в нестабильных условиях антропогенных ландшафтов, там, где вероятность отклонений в реализации онтогенетической программы или регенеративных процессах относительно высока. Частоты морфологических аномалий у сеголеток, выращенных в лабораторных условиях, и в выборках из популяций городских территорий приведены в табл. 3.

Как уже отмечалось выше, аномалии, возникающие в результате отклонений в развитии и регенерации, нередко обусловлены влиянием поллютантов на активность щитовидной железы, ответственной за процессы клеточного деления и формообразования, т.е. возникает определенная рассогласованность процессов клеточного роста, пролиферации, уровня обмена, активности тиреоидных гормонов и их катализма. Вероятно, наличие зависимостей между митотическим ин-

дексом и индексом печени у сеголеток из популяций зоны многоэтажной застройки – следствие того, что здесь выживают особи с высокой степенью сбалансированности упомянутых выше показателей. Эта физиологическая особенность дает возможность популяциям существовать и воспроизводиться в условиях высоких антропогенных нагрузок. В пользу данного предположения свидетельствует отсутствие аномальных животных среди головастиков и сеголеток II зоны в эксперименте, где онтогенез протекал в чистой воде.

Аналогичные данные были получены нами при изучении выживаемости икры остромордых лягушек. В условиях лабораторного эксперимента удалось показать высокую толерантность эмбрионов *R. arvalis* из популяции II зоны, которая была выявлена при помещении кладок в чистую воду, что приводило к значительному ($p < 0.001$; $\chi^2 = 152.19$) увеличению эмбриональной выживаемости (96.7–93.6%), превышающему значения (78.8–32.4%) для кладок из загородной популяции (Вершинин, Трубецкая, 1992), что, по нашему мнению, свидетельствует о наличии адаптивных изменений в популяциях городской черты.

Таким образом, морфофизиологическая специфика и уровень ее согласованности с процессами, протекающими на цитологическом и тканевом уровнях, являются специфической чертой популяций, населяющих местообитания с наибольшей степенью антропогенной трансформации и могут способствовать выживанию новой генерации в условиях загрязнения и урбанизации.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-04-48061).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алов И.А. Очерки физиологии митотического деления клеток. М.: Медицина, 1964. 302 с.
- Вершинин В.Л. Городские группировки земноводных как критерий оценки состояния мелких водоемов // Проблемы экологии Прибайкаля. Иркутск, 1982. Ч. 1. С. 19–22.
- Вершинин В.Л. Видовой состав и биологические особенности амфибий ряда промышленных городов Урала. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Свердловск, 1983. 24 с.
- Вершинин В.Л. Морфологические аномалии амфибий городской черты // Экология. 1989. № 3. С. 58–66.
- Вершинин В.Л. Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий. Автореф. дис. ...докт. биол. наук. Екатеринбург, 1997. 47 с.
- Вершинин В.Л., Трубецкая Е.А. Смертность бурых лягушек в эмбриональный, личиночный и постметаморфический период при разном уровне антропогенного воздействия // Животные в условиях антропогенного ландшафта. Екатеринбург, 1992. С. 12–20.
- Ганинтуллина Э.З. Явления гипертрофии и гиперплазии при изменении скорости роста и развития личинок амфибий. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Свердловск, 1975. 22 с.
- Ганинтуллина Э.З. Влияние плотности экспериментальных популяций и температуры на митотическую активность и размеры клеток эпителия роговицы у амфибий // Экспериментальная экология низших позвоночных. Свердловск, 1978. С. 92–111.
- Епианова О.И. Гормоны и размножение клеток. М.: Наука, 1965. 243 с.
- Иберт Д. Взаимодействующие системы в развитии. М.: Мир, 1968. 192 с.
- Кальюхте Х. Сравнительное изучение размеров клеточных ядер двух сортов озимой пшеницы при использовании разных фиксаторов // Изв. АН ЭССР. Сер. биол. 1968. Т. 17. № 1. С. 15–19.
- Ли Д.Е. Действие радиации на живые клетки. М.: Госатомиздат, 1963. 288 с.
- Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистомеханика. М.: Мир, 1969. 645 с.
- Оду Ю. Основы экологии. М.: Мир, 1975. 740 с.
- Пястолова О.А., Вершинин В.Л. Некоторые цитологические особенности остромордой лягушки на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа // Экология. 1999. № 1. С. 30–35.
- Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М.: Сов. наука, 1957. 476 с.
- Соколов В.Е., Кузнецов Г.В. Суточные ритмы активности млекопитающих. М.: Наука, 1978. 263 с.
- Сюзюмова Л.М. Влияние экологических факторов на развитие и регенерацию конечностей личинок остромордой лягушки на фоне ингибции тиреоидной функции витамином A // Экологические аспекты скорости роста и развития животных. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1985. С. 85–98.
- Токарь В.И., Жаворонков А.А., Щербаков С.В. Фтор и эндокринная система. Новосибирск: Наука, 1991. 193 с.
- Тестов Б.В. Влияние радиоактивного загрязнения на популяции мышевидных грызунов. Автореф. ... дис. докт. биол. наук. Пермь, 1993. 48 с.
- Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск: Урал. фил. АН СССР, 1968. 387 с.
- Borkin Leo., Pliklik M.M. The occurrence of polymely and polydactyly in natural populations of anurans of the USSR // Amphibia-Reptilia. 1986. V. 7. № 3. P. 205–216.
- Dournon Chr., Chibon P. Influence de la température, de l'âge, et des conditions hormonales (thyroxine) sur la prolifération cellulaire chez la jeune larve et pendant la métamorphose du crapaud *Bufo bufo* L. (Amphibiens, Anoure) // W. Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organism. 1974. V. 175. № 1. P. 223–229.

- Fischman J. Missing metamorphosis // Science. 1996. V. 271. № 5246. P. 148–149.
- Gorbman A., Bern H.A. Textbook of Comparative Endocrinology. New York: John Wiley & Sons, 1962. 468 p.
- Hebard W.B., Brunson R.B. Hind limb anomalies of a western Montana population of the Pacific tree frog, *Hyla regilla* Barbour and Girard // Copeia. 1963. № 3. P. 570–572.
- Menon J.G., Ren Ken, Drews R.C. Cisplatin inhibits metamorphosis of Bull frog tadpoles, via thyroid suppression // Amer. Zool. 1996. V. 36. № 5. P. 117.
- Talvi T. Naturally occurring limb abnormalities in anurans of the Estonia // 7-th Ord. Gen. Meet. Soc. Eur Herpetol. 15–19 Sept. 1993, Barcelona, Spain: Progr. and Absr. Barcelona, 1993. P. 124.
- Vershinin V.L. Types of Morphological Anomalies of Amphibians in Urban Regions // Amphibian Populations in the Commonwealth of independent States: Current Status and Declines / Ed. Kuzmin S.L., Dodd C.K., Jr., Pikulik M.M. Moscow: Pensoft, 1995. P. 91–98.
- Warren M.R. Tyroxin and oxygen consumption in frogs // J. Exp. Zool. 1940. V. 83. P. 127–156.