

УДК 591:597.6

© 2017

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЛАНИНА ПЕЧЕНИ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ – *RANA ARVALIS* NILSSON, 1842 ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СРЕДЫ

В.Л. Вершинин^{1,2}, М.В. Чибиряк¹, Ю.С. Галиева²

¹Россия, г. Екатеринбург, Институт экологии растений и животных УрО РАН

²Россия, г. Екатеринбург, Уральский федеральный университет
им. первого Президента России Б.Н. Ельцина

Проведён количественный учёт и выполнена размерная оценка гранул меланина в печени сеголетков остромордой лягушки из лесной популяции, с урбанизированных территорий и с головной части Восточно-Уральского радиоактивного следа с помощью программного комплекса SIAMS Fotolab. Присутствие большого количества гранул меланина является своеобразным качественным индикатором патологического состояния печени. Сравнительный статистический анализ подтвердил наличие такого специфического признака и позволил дать предварительную количественную оценку состояния печени как индикационного параметра здоровья среды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *RANA ARVALIS*, ПЕЧЕНЬ, МЕЛАНИН, УРБАНИЗАЦИЯ, РАДИОНУКЛИДЫ

Популяции земноводных – наиболее просто организованных наземных позвоночных, имеющих общий план строения с человеком – удачный модельный объект для выполнения различных исследований, связанных с оценкой здоровья среды. Высокая численность новой генерации бесхвостых амфибий обеспечивает сбор необходимого для исследований объёма материала без ущерба для популяций.

Использование пойкилотермных позвоночных в качестве индикаторов загрязнения окружающей среды является одним из самых актуальных направлений экологических исследований [1, 2]. В частности, бесхвостые амфибии уже применяются в качестве тест-системы для оценки антропогенных биоценозов [3]. *R. arvalis* – широко распространённый и во многих биотопах многочисленный, эвритопный вид с протяжённым евроазиатским ареалом от Ла-Манша до Забайкалья и от Казахстана до Заполярья. Остромордая лягушка, несмотря на низкий уровень метаболизма, отличается высоким накоплением ⁹⁰Sr [4]. Печень как орган, чутко реагирующий на изменения химизма среды и отвечающий за детоксикацию организма,

наиболее чувствительна к биогеохимическим особенностям ландшафтов [5], в том числе и антропогенному загрязнению среды. Известно, что в печени амфибий, населяющих антропогенно-преобразованные биоценозы, отмечаются существенные биохимические различия по сравнению с животными из сравнительно малоизменённых местообитаний [6–9].

Одной из особенностей печени амфибий является наличие скоплений пигмент-содержащих клеток, отражающих процесс интенсивного катаболизма погибших эритроцитов [10]. Известно, что обычно максимальное их количество наблюдается в июне, а меньшее зимой и осенью [11]. Существует точка зрения, что при снижении активности гепатоцитов пигментные клетки выполняют замещающую функцию [12]. Установлено, что под действием поллютантов гранулы меланина становятся отчётливо видны на фоне картины редукации коллагеновых прослоек, составляющих печени, что является специфическим признаком патологии печени амфибий [13]. Но подобные изменения в печени амфибий из популяций, подверженных разным типам и степени антропогенного

воздействия, исследованы недостаточно. Так, сведений о количественных характеристиках данного явления у земноводных не встречается в научной литературе. Известные результаты чаще интерпретируются в категориях: "норма – адаптивные изменения – патологические изменения", чем оцениваются количественно.

Целью настоящего исследования было выполнение количественных оценок содержания гранул меланина и их размеров в печени сеголетков остромордой лягушки в зависимости от степени и характера загрязнения среды и проведение сравнительного анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала был проведён в 2010 г. Сеголетки остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilsson, 1842) были отловлены в популяциях с территории городской агломерации г. Екатеринбурга. В пределах городской агломерации выделены четыре зоны [14], к которым приурочены места обитания амфибий: центральная часть города (где амфибии отсутствуют) с многоэтажной застройкой, массивными асфальтовыми покрытиями, водоёмами с сильным промышленным загрязнением, мелкими реками и ручьями, забранными в трубы (I зона); районы многоэтажной застройки с осваиваемыми территориями, пустырями, участками с открытыми почвами, малыми водоёмами с высоким уровнем загрязнения (зона II); районы малоэтажной застройки, занятые домами частного сектора с садами и огородами, пустырями, парками (зона III); лесопарковая зона – местообитания этой территории, главным образом, подвержены действию рекреационной нагрузки, районы многоэтажной застройки с осваиваемыми территориями, пустырями, участками

с открытыми почвами, малыми водоёмами с высоким уровнем загрязнения (IV), в качестве контроля (К) использована выборка из загородной популяции, населяющей массив соснового леса (сосняк сфагново-хвощовый) в 23 км от г. Екатеринбурга. Приемлемость настоящей типизации ежегодно подтверждается гидрохимическими анализами [15]. В градиенте урбанизации существенные отличия наблюдаются по содержанию сульфатов, хлоридов, общей минерализации водоёмов, pH [16] (табл. 1).

Подробные описания местообитаний, координаты и развёрнутые данные по концентрациям поллютантов содержатся в открытой базе данных Dryad – <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.52j55>. Гидрохимические показатели нерестовых водоёмов определены в лаборатории физико-химических анализов Уральского государственного горного университета. Выборки с урбанизированной территории взяты из популяции по ул. Ясная (зона II), Шарташского и Калиновского лесопарков (зона IV). Выборка с загрязнённой радионуклидами территории сделана из популяции остромордой лягушки, населяющей юго-западный берег оз. Бердениш (территория Восточно-Уральского заповедника, Челябинская обл.). Участок отлова находится на оси следа в 13 км от эпицентра радиационной аварии. Современная плотность загрязнения почвы ⁹⁰Sr в зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРСа) варьирует в пределах 6740–16690 кБк/м² [17]. В качестве загородного контроля использованы участок (23-й км Режевского тракта и нового Московского тракта в пригороде г. Екатеринбурга). Объём материала по морфофизиологии составил 242 особи, на предмет содержания гранул меланина печень была исследована у 77 сеголетков остромордой лягушки. Морфологические про-

Таблица 1

Уровень загрязнения поверхностных вод в городских местообитаниях

Местообитание	Зона	Хлориды (мг/дм ³)	Сульфаты (мг/дм ³)	Минерализация (мг/дм ³)	pH	N
Ясная	II	38,8±4,6	59,6±14,3	578,7±61,8	7,8±0,2	9
Шарташский лесопарк I	IV	11,2±5,7	21,6±17,6	178,4±75,6	7,5±0,3	6
Калиновский лесопарк I	IV	9,3±4,9	13,3±15,2	176,6±65,5	7,3±0,2	8
Режевской тракт 3	К	10,6±4,6	10,6±14,3	130,1±61,8	7,0±0,2	9

меры животных снимались цифровым штангенциркулем Kraftool с ценой деления 0,01 мм. Измерение массы тела и печени производилось на электронных весах Shimadzu и торсионных весах с ценой деления 0,2 мг. Определение относительного веса печени производилось в соответствии с методом морфофизиологических индикаторов [18], упитанность рассчитывалась как отношение массы к длине тела (условные единицы). После вскрытия животные фиксировались в 70%-м растворе этилового спирта.

Для изучения размера и количества гранул меланина при вскрытии печень помещалась между предметным стеклом и плоским стеклом x10-кратной лупы ГОСТ 8309–57 с нанесенной на него шкалой с ценой деления 0,1 мм. После чего производилась фотосъемка слоя печени толщиной 0,5 мм у каждого животного с помощью цифровой камеры Nikon Coolpix P 5100i. Количественный учёт гранул (в шт.) и их размерных характеристик, а также размера печени был проведён с помощью программных средств. Площадь проекции печени на плоскость для каждого снимка была рассчитана с помощью программы – ImageJ 1.48v (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Для подсчёта количества и размерных характеристик гранул меланина была применена компьютерная программа обработки изображений SIAMS Fotolab

4.0.4.x-r4679 (<http://siams.com/>). Статистическая обработка результатов выполнена в программном пакете Statistica for Windows 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённый дисперсионный анализ результатов по традиционным морфофизиологическим параметрам показал, что упитанность $F(3,215)=22,754$, $p<0,000001$), длина тела $F(3,215)=23,004$, $p<0,000001$) и масса животных $F(3,215)=22,921$, $p<0,000001$) на антропогенно-преобразованных территориях оказались значимо выше, что связано с преимущественным выживанием крупных сеголетков в условиях загрязнения среды [19] (табл. 2). Объёмно-поверхностное соотношение у крупных животных позволяет им выживать в более загрязнённой среде, т.к. они обладают большей массой на единицу поверхности, что повышает их толерантность [20–22].

Установлено, что в изменении индекса печени и площади проекции печени на плоскость в градиенте антропогенной трансформации среды отмечается сходная тенденция – они снижаются с ростом антропогенного воздействия (табл. 2, 3). Это объясняется ростом энергозатрат на физиологические адаптации, а в случае ВУРСа и на репаративные процессы в организ-

Таблица 2

Основные морфофизиологические параметры сеголетков *R. arvalis*

Местообитание	длина тела, мм	масса тела, мг	упитанность	индекс печени, ‰	N
ВУРС	22,4±0,67	902,9±85,8	39,7±2,82	29,0±3,61	10
Зона многоэтажной застройки	16,4±0,41	401,1±27,0	23,5±1,05	34,6±1,39	50
Лесопарковая зона	17,1±0,37	451,5±24,3	24,9±0,88	44,7±4,84	94
Загородная популяция	13,9±0,44	272,7±32,2	17,5±1,19	43,9±1,60	65

Таблица 3

Основные параметры печени сеголетков *R. arvalis*

Местообитание	S проекции печени, мм ²	к-во гранул на 4 мм ²	средний размер гранул, мм	общее количество гранул, шт.	N
ВУРС	34,4±1,5	360,7 ±21,9	0,078±0,0052	3011,1±309,8	13
Зона многоэтажной застройки	23,6±1,7	214,7 ±18,6	0,072±0,0027	407,6±60,5	18
Лесопарковая зона	39,2±4,0	220,1 ±16,2	0,074±0,0018	625,5±50,2	24
Загородная популяция	57,5±4,97	115,3 ±16,7	0,064±0,0012	456,2±35,6	22

ме сеголетков. При этом изменение первого параметра оказалось статистически незначимым ($F(3,215)=1,7101$, $p=0,16590$), а для второго показателя различие оказалось существенным ($F(3,73)=13,480$, $p<0,000001$).

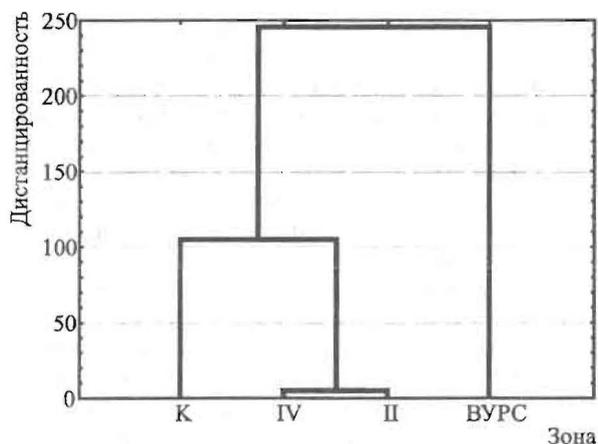
Расчёт среднего числа гранул на единицу площади показал, что данный показатель ($F(3,223)=26,609$, $p<0,000001$) значимо растёт у животных из популяций, населяющих урбанизированные территории, и особенно высок в популяции с территории, загрязнённой радионуклидами (табл. 3). Сходным образом существенно ($F(3,73)=5,4215$, $p<0,002$) меняется и средний размер гранул в зависимости от уровня и типа антропогенной трансформации среды (табл. 3).

Общее число гранул с высокой степенью значимости ($F(3,73)=92,080$, $p<0,00001$) отмечается в печени животных с территории ВУРСа, несмотря на то, что площадь и индекс печени у особей данной выборки минимальны (табл. 3).

Оценка дистанцированности (евклидовы расстояния, метод полной связи) изученных выборок по размеру гранул меланина и их количеству на 4 мм^2 показала, что анализируемый материал разделился на 3 кластера: 1 – животные с загородной территории, 2 – животные с урбанизированной территории (зоны II и III), 3 – ВУРС (рис. 1).

Дегенеративные изменения тканей печени и наличие скоплений меланиновых гранул для популяций остромордой лягушки, населяющих территории, загрязнённые радионуклидами, описаны ранее. К сожалению, авторы не дают количественных оценок, ограничиваясь качественным анализом явления.

Впервые возможность использования содержания гранул меланина в тканях печени *R. arvalis* была отмечена в отчёте о НИР, выполненной на территории Восточно-Уральского заповедника [23], т.к. наличие дистрофии ткани печени и крупные меланоциты заметны в ходе внешнего осмотра при вскрытии. Пигментные скопления отмечены в печени животных, отловленных в конце августа 2004 года, т.е. в период, когда в норме количество пигментных клеток существенно меньше. Известно, что обычно максимальное их количество наблюдается в июне, а меньшее зимой и осенью [11]. Скопления пигментсодержащих клеток в печени амфибий



II – зона многоэтажной застройки, IV – лесопарковая зона, К – загородная популяция; ВУРС – Восточно-Уральский радиоактивный след

Рис. 1. Дистанцированность изученных выборок по размеру гранул меланина и их количеству на 4 мм^2

отражают процесс интенсивного катаболизма погибших эритроцитов [10] и, вероятно, других форменных элементов крови в условиях радионуклидного загрязнения. Существует точка зрения, что при снижении активности гепатоцитов пигментные клетки выполняют замещающую функцию [12]. Гранулы меланина отчетливо видны на фоне картины редукции коллагеновых прослоек, составляющих печени, что является специфическим признаком патологии печени амфибий [13]. Следовательно, патологическое состояние печени, заметное даже при её внешнем осмотре, может быть охарактеризовано как хронический токсикоз.

Аналогичные результаты получены В.Н. Курановой и С.В. Савельевым [24–28] на сеголетках *R. arvalis*, населяющих территорию 30-км зоны Сибирского химического комбината (Томская область). Так, данными авторами в районе АЭС окрестностей г. Северска отмечены дегенеративные изменения и скопления меланина в печени, а у популяции из района хранилища радиоактивных отходов вблизи р. Ромашка зафиксирована очаговая метаплазия печени личинок.

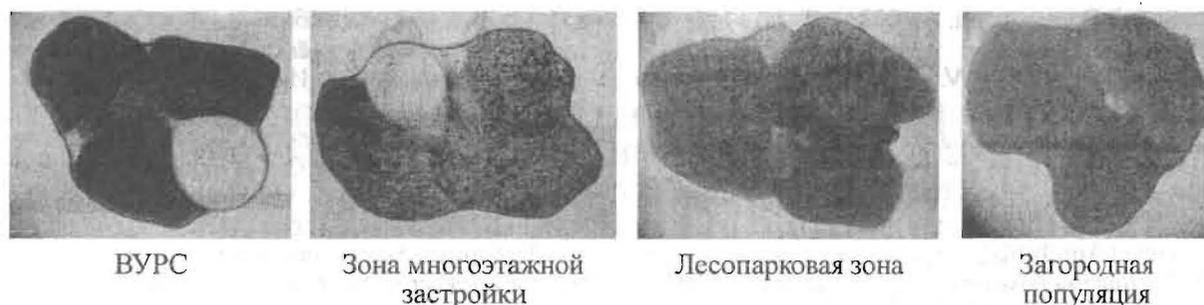


Рис. 2. Скопления гранул меланина в тканях печени сеголетков *R. arvalis* (фото В.Л. Вершинина)

Таким образом, при анализе снимков тканей печени сеголетков остромордой лягушки из популяций, подверженных разному типу и разной степени антропогенного воздействия, удалось установить присутствие значительных скоплений пигментсодержащих клеток, что, по видимому, отражает процесс интенсивного катаболизма погибших эритроцитов и, вероятно, других форменных элементов крови в условиях значительного загрязнения среды (рис. 2) и является хорошим индикатором патологии.

Полученные впервые количественные оценки общего числа гранул, их числа на единицу площади, а также средних размеров зёрен меланина свидетельствуют о том, что изменение количества и размеров гранул меланина в печени у лягушек является показателем токсического действия среды обитания на амфибий.

Поскольку данное исследование основывается на сравнительно небольшом количестве материала, полученные выводы носят предварительный характер, а изучение описанного явления требует продолжения работ в данном направлении.

Исследование поддержано программой 211 Правительства Российской Федерации, соглашение № 02.А03.21.0006, программой УрО РАН "Живая природа" № 12 (проект 15-12-4-25), грантом РФФИ 16-04-01831а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cooke A.S. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field // Environ. Pollut. Ser.A. – 1981. – V. 25. – P. 123–133.

2. Tyler M.J. Natural pollution monitors // Aust. Nat. Hist. – 1983. – V. 21. – P. 31–33.
 3. Roy D. Amphibians as environmental sentinels // J. Biosci. – 2002. – V. 27. – No. 3. – P. 187–188.
 4. Биоиндикация радиоактивных загрязнений. – М.: Наука, 1999. – 384 с.
 5. Шварц С.С. Влияние микроэлементов на животных в естественных условиях рудного поля // Тр. Биогеохим. лаб. АН СССР. – 1954. – Т. 10. – С. 76–81.
 6. Hopkins W.A. Amphibians as models for studying environmental change // Institute of Laboratory Animal Resources J. – 2007. – V. 48. – No. 3. – P. 270–277.
 7. Falushinnska H., Loumbordis N., Romanchuk L., Stolyar O. Validation oxidative stress responses in two populations of frog from Western Ukraine // Chemosphere. – 2008. – V. 73. – No. 7. – P. 1096–1101.
 8. Fenoglio C., Boncompagni E., Fasola M. et al. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta* // Ecotoxicol Environ Saf. – 2005. – V. 60. – No. . – P. 259–268.
 9. Loumbourdis N.S. Liver histopathologic alterations in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Northern Greece // Arch Environ Contam Toxicol. – 2007. – V. 53. – No. 3. – P. 418–425.
 10. Калашникова М.М. Ультраструктура клеток печени рыб и амфибий при катаболизме погибающих эритроцитов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – Т. 129. – № 1. – С. 117–120.
 11. Акуленко Н.М. Сезонная динамика количества и функциональной активности макрофагов и пигментных клеток в печени бесхвостых ам-

- фибий // Вестн. зоол. – 1998. – Т. 32. – № 4. – С. 86–93, 124.
12. Barni S., Bertone V., Croce A.C. et al. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians // *J. Anat.* – 1999. – V. 195. – No. 1. – P. 19–25.
13. Акуленко Н.М. Гистологические изменения в печени зеленых лягушек *Rana esculenta complex* (Amphibia) антропогенных ландшафтов // Научные ведомости. Сер. экология. – 2005. – № 1(21), вып. 3. – С. 76–78.
14. Вершинин В.Л. Распределение и видовой состав амфибий городской черты Свердловска // Информационные материалы Института экологии растений и животных. – Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980. – С. 4–7.
15. Vershinin V.L., Vershinina S.D., Berzin D.L. et al. Long-term observation of amphibian populations inhabiting urban and forested areas in Yekaterinburg, Russia // *Scientific Data.* – 2015. – 2. Article number 150018. – P. 1–13. – doi: 10.1038/sdata.2015.18 (2015).
16. Вершинин В.Л. Урбанистический градиент и его многолетняя динамика как основа эффективного контроля состояния популяций амфибий // Вопросы герпетологии. Материалы Четвертого съезда Герпетологического общества им. А. М. Никольского. – СПб: Русская коллекция, 2011. – С. 56–65.
17. Molchanova I., Mikhailovskaya L., Antonov K. et al. Current Assessment of Integrated Content of Long-Lived Radionuclides in Soils of the Head Part of the East Ural Radioactive Trace // *J. of Environm. Radioact.* – 2014. – V. 138. – P. 238–248.
18. Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных / Труды ИЭРиЖ АН СССР. Вып. 58. – Свердловск, 1968. – С. 132–173.
19. Вершинин В.Л. Динамика численности личинок и сеголеток остромордой лягушки в условиях промышленного города // Вопросы герпетологии. – 1985. – С. 46–47.
20. Иванова Н.Л. Об использовании личинок амфибий в качестве биологических индикаторов состояния водоёмов // Проблемы экологии Прибайкалья. – Иркутск, 1982. – Ч. 5. – С. 79–80.
21. Вершинин В.Л. Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий: Автореф. дисс... уч. степени докт. биол. наук. – Екатеринбург, 1997. – 47 с.
22. Вершинин В.Л., Середюк С.Д., Черноусова Н.Ф. и др. Пути адаптационного наземной фауны к условиям техногенных ландшафтов. – Екатеринбург: УрО РАН, Банк культурной информации, 2006. – 183 с.
23. Вершинин В.Л., Середюк С.Д. Отчет о научно-исследовательской работе за 2005 г., выполненной на территории Южно-Уральского заповедника. Амфибии. – Екатеринбург, 2005. – С. 3–7. (рукоп.)
24. Куранова В.Н. Фауна и экология земноводных и пресмыкающихся юго-востока Западной Сибири: Автореф. дис... уч. степени канд. биол. наук. – Томск, 1998а. – 24 с.
25. Куранова В.Н. Фауна и экология земноводных и пресмыкающихся юго-востока Западной Сибири: Дисс... канд. биол. наук. – Томск, 1998б. – 411 с.
26. Куранова В.Н. Антропогенное воздействие на земноводных и пресмыкающихся. Проблемы их охраны на юго-востоке Западной Сибири // Амфибии и рептилии в Западной Сибири: сохранение биоразнообразия, проблемы экологической этики и экологического образования. – Новосибирск, 2003. – С. 39–51.
27. Kuranova V.N., Saveliev S.V. The effect of Radiation and Chemicals on Amphibian Ontogeny // *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union.* Sofia-Moscow. – 1997. – V. 2. – P. 167–168.
28. Kuranova V.N., Saveliev S.V. Disturbances of ontogeny in natural populations of amphibians on industrially polluted territories // 10th Ordinary General Meeting Societas Europaea Herpetologica (SEH), 6–10 September 1999, Iraceo. – Iraceo, 1999. – P. 93–94.