

Э. З. ГАТИЯТУЛЛИНА

МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОКРОВНОГО ЭПИТЕЛИЯ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ И ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Химические поллютанты, поступающие в окружающую среду, помимо общетоксического действия способны оказывать мутагенный эффект на клетки высших и низших растений и, возможно, человека (Ворошилин и др., 1973, 1975; Гилева и др., 1972; Sliarma et al., 1987). Действие химических соединений на клеточное деление и индукцию хромосомных аномалий — важнейший критерий для идентификации повреждения генетических систем. Многочисленные работы данного профиля выполнены, как правило, на культуре клеток человека и на соматических клетках экспериментальных животных *in vivo*. Цитогенетические исследования на животных из природных популяций нам не известны. Мы изучали влияние выбросов медеплавильного комбината на клеточное деление и возникновение хромосомных перестроек в клетках эпителия роговицы обыкновенных полевков и остромордой лягушки, отловленных в зоне действия предприятия.

Материал и методика

В качестве объекта исследования была выбрана эпителиальная ткань роговицы, наиболее удобная для цитологического анализа, поскольку она представляет собой бессосудистую систему: метаболиты здесь поступают в клетки равномерно через базальную мембрану; клетки эпителия вплотную прилегают друг к другу, образуя гомогенные слои (Заварзин, Щелкунов, 1954). Протоплазматический рост в таких тканях можно измерить путем подсчета числа клеток в популяции или в определенной выборке из нее (Иберт, 1968).

Роговая оболочка *Anura* в общем подобна роговице большинства позвоночных (Попов, 1938). Но есть немаловажное различие в развитии роговицы: у высших позвоночных оно происходит на ранних стадиях эмбрионального развития, у бесхвостых амфибий этот период сильно растянут (заканчивается много позже, после выхода зародыша из яйцевой оболочки). Последнее обстоятельство в значительной мере облегчает изучение развития этой части глаза именно у бесхвостых амфибий (Попов, 1938)

Материал фиксировали в ацеталкоголе (смесь -из трех частей абсолютного спирта и одной части ледяной уксусной кислоты). Этот фиксатор удовлетворительно сохраняет прижизненные параметры клеток и обеспечивает успешную окраску хромосом (Лилли, 1969). После фиксации в течение 2 ч материал хранили в 70-градусном спирте. Тотальные препараты роговицы готовили по обычной методике (Епифанова, 1965) окрашивали гематоксилином по Бёмеру (Роскин, Левинсон, 1957). В роговице подсчитывали количество митозов в пятидесяти полях зрения, учитывая митозы, располагающиеся в периферических и центральных участках эпителия, так как известно, что интенсивность деления клеток в разных зонах роговицы у амфибий неодинакова (Стрелин, 1934; 1935). Головастики амфибий эквивалентны поздним эмбриональным стадиям высших позвоночных и проявляют значительные физиологические, анатомические и гистологические изменения в течение развития.

Митотическая активность тканей, как полагает ряд исследователей (Соколов, Кузнецов, 1978), — один из показателей общей активности организма и его физиологического состояния. Эпителий роговицы непосредственно соприкасается с загрязняющими среду веществами и выполняет защитную функцию (что нечасто встретишь среди меристемных тканей в животном организме). Митотическую активность при исследовании полевок определяли на тотальных препаратах роговицы, приготовленных обычным способом (Епифанова, 1965). Просматривали по сто полей зрения на препарате, учитывая делящиеся клетки среди 15 тыс. общего их количества. Отмечали клетки с аномалиями хромосом в поздней анафазе и ранней телофазе. Сравнения полученных данных проводили по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование амфибий проведено в 1988 г. в окрестностях крупного медеплавильного комбината на Южном Урале. Юго-Восточная зона города по направлению господствующих ветров лишена растительности и не пригодна для обитания позвоночных животных. Единичные кладки остромордой лягушки были обнаружены в водоемах на северо-западе и в 1 и 2 км к югу от комбината — вблизи автодороги. На южной окраине города (в 3 км от источника загрязнения) в водоеме № 1 (900 м²) было подсчитано 150 кладок икры остромордой лягушки общей численностью около 110 тыс. яиц. Для сравнения обследовали водоемы № 2, 3 на окраинах двух деревень (в 6 и 15 км к югу от города). В № 2 обнаружили 71 кладку (64 тыс. икринок), а в № 3—16 (около 27 тыс.).

По результатам многочисленных лабораторных экспериментов известно, что яйца и личинки большинства видов земноводных на воздействие различными физико-химическими препаратами отвечают определенными морфологическими и физиологическими изменениями. Характерные изменения их постэмбрионального развития легко поддаются качественному и количественному определению. В качестве основных критериев влияния загрязнения в природных условиях используют показатель смертности яиц, постэмбриональную скорость роста и развития, изменение пигментации, морфологические уродства.

Размножение лягушек в трех обследованных нами водоемах началось практически одновременно — 23 апреля. Эмбриональное развитие продолжалось две недели. Смертность в этот период была минимальна по сравнению с эмбриональной смертностью в изученных популяциях этого вида. Отмечено снижение скорости роста головастиков в водоеме № 2. Это могло быть связано с относительно более высокой численностью хищников (рис. 1, 2). Для сравнения приведены (табл. 1, 2) ранее полученные нами данные при изучении скорости роста и развития личинок остромордой лягушки, обитающей вблизи Полевского криолитового завода (Свердл. обл.) и в 6 км от него. Результаты цитологического и статистического анализа тканевого роста у личинок говорят об общих закономерностях динамики митотической активности и изменения величины клеток в процессе морфогенеза остромордой лягушки. Совокупность данных свидетельствует о высокой толерантности личинок остромордой лягушки к химическому загрязнению среды.

В конце личиночного периода определили численность головастиков. В водоеме № 1 было около 12,5 тыс. личинок, что I составляет 11,4 % от общего количества отложенных, в этом водоеме икринок. В № 2 произошла наибольшая потеря личинок: их осталось не более 1 тыс., или 1,6%. В № 3 перед метаморфозом находилось около 2,6 тыс. головастиков, т.е. почти 10% от общего количества яиц, отложенных лягушками.

Выход сеголеток на сушу начался одновременно в трех водоемах — 23 июня. Масса тела сеголеток, завершивших метаморфоз, в водоемах вблизи источника эмиссии и двух контрольных различалась (табл. 3). Наибольшей массой тела, так же как и индексом печени, обладают лягушки, отловленные в 15 км от комбината. Эти различия нивелируются после роста сеголеток па суше. Сеголеток с аномалиями развития и заболеваниями немного: 1,6 и 1,4 % в водоемах № 1,2 соответственно, в № 3 он рачительно ниже — 0,2%. Показатели митотической активности у сеголеток в сравниваемых водоемах существенно не различаются. Вариабельность значений размеров тела сеголеток и митотической активности не выходит за пределы этих показателей у сеголеток, обитающих в природных лесных водоемах (табл. 4). Однако при исследовании клеток эпителиальной ткани роговицы у части сеголеток, отловленных в окрестностях ком-

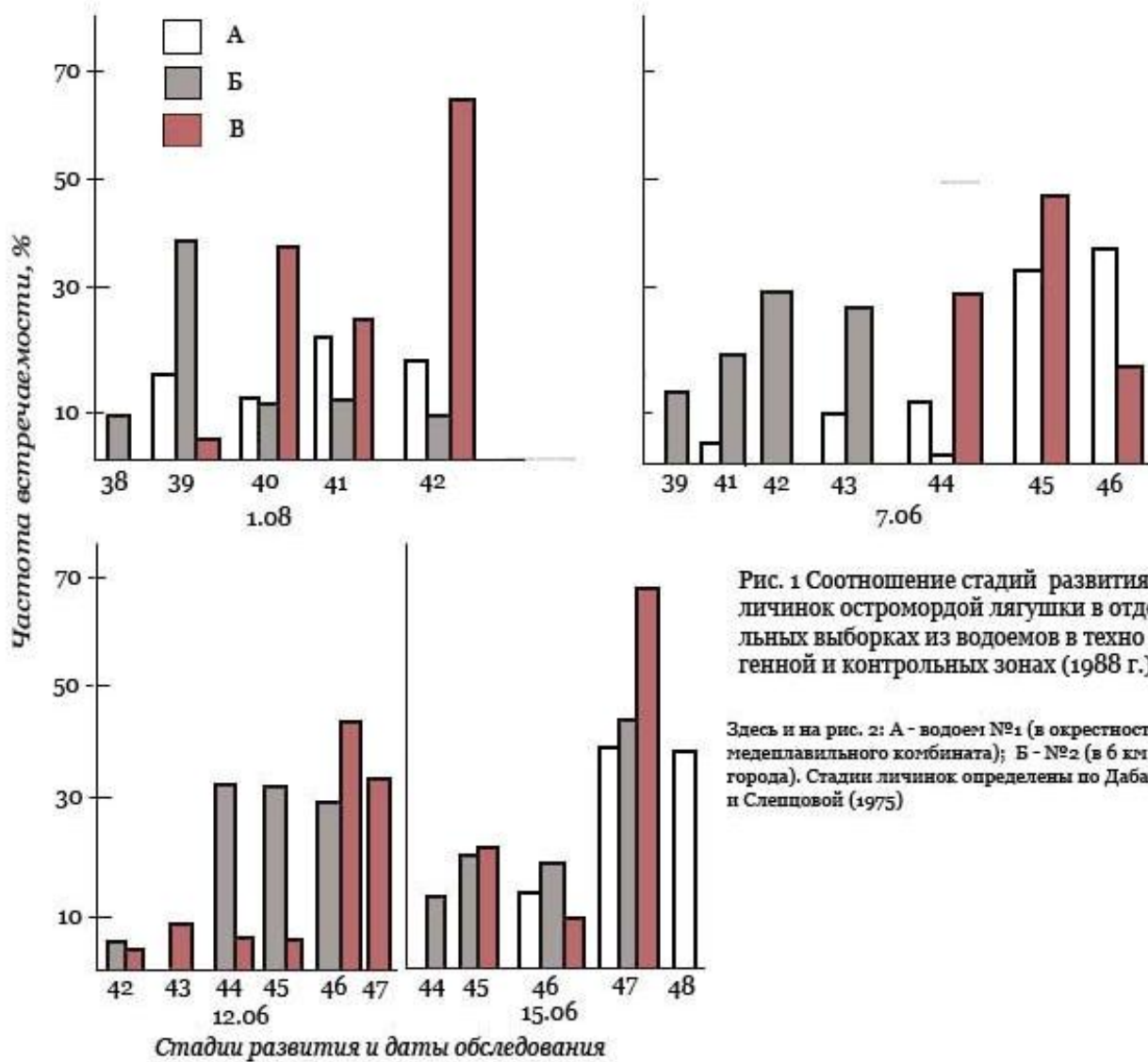


Рис. 1 Соотношение стадий развития личинок остромордой лягушки в отдельных выборках из водоемов в техногенной и контрольных зонах (1988 г.)

Здесь и на рис. 2: А - водоем №1 (в окрестностях металлургического комбината); Б - №2 (в 6 км от города). Стадии личинок определены по Дабаган и Слепцовой (1975)

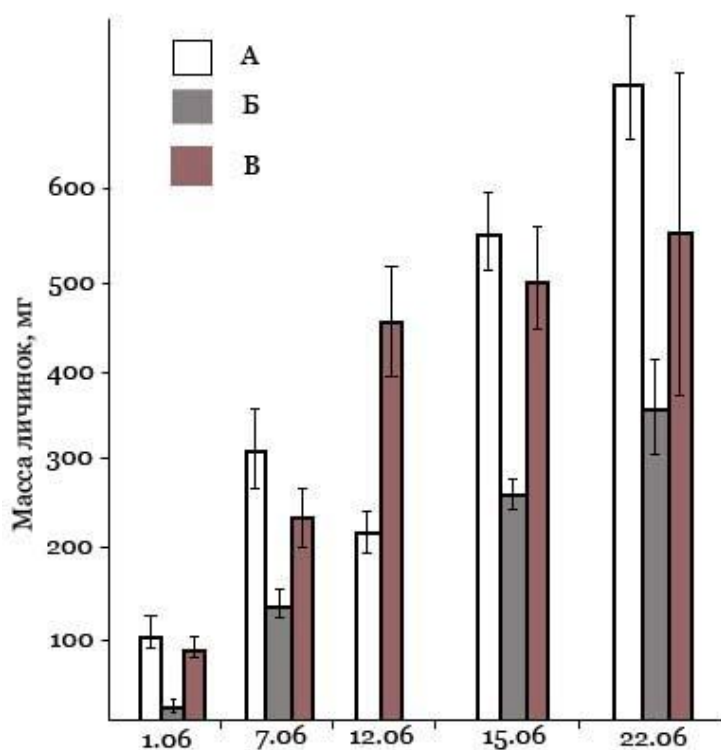


Рис. 2 Рост личинок остромордой лягушки в техногенной и контрольных зонах (1988 г.)

Таблица 1

**Митотическая активность и размеры клеток эпителия роговицы личинок,
развивавшихся в водоеме № 1**

Дата отлова	Стадия развития	Масса тела, мг	МА	Размер клетки, мкм ²	n
7.06	26,3	30,1±3,6	15,4±4,4	148,7±8,4	8
»	26,4	38±10,9	28,2±13,7	137,1±13,1	5
14.06	26,3	50,7±2,8	13,2±3	125,3±13,1	11
»	26,4	78±7,1	17,7±4,2	118,1±8,5	9
19.06	26,5	104,1±13,6	18,9±4	107,3±14,7	8
»	26,6	119,2±12,2	18,4±6,2	116,1±14	5
»	26,7	127,9±8,9	24,4±5	98,5±3,8	8
5.07	30 _I	407,8±22	15,2±4,4	53,6±1,9	6
»	30 _{II}	444,7± 36,7	24,3±6,7	48,6±3	6
»	30 _{все}	426,2±24,4	19,8±3,5	51,1±1,8	12
»	31	377,5±19,5	21,7±4,9	58,4±1,5	16
9.07	30 _I	578,6±43,1	27,9±6,4	Нет свед.	8
»	30 _{II}	611,6±28,1	30,9±3,9	»	18
»	30 _{все}	595,1±22,1	29,4±2,9	»	26
»	31	525,3±11,2	31,5±2,7	56,2±4,5	22
13.07	31	517,8±16,5	20,6±3,1	67,3±4,4	20

Примечание. Здесь и в табл. 2 – 4 количество митозов подсчитано в пятидесяти полях зрения; во всех таблицах: МА – митотическая активность ; стадии личинок определены по Терентьеву (1950)

Таблица 1

**Митотическая активность и размеры клеток эпителия роговицы личинок,
развивавшихся в водоеме № 2**

Дата отлова	Стадия развития	Масса тела, мг	МА	Размер клетки, мкм ²	n
7.06	26,3	45,1±2,4	11,7±1,5	128,0±12,5	16
»	26,4	63,2±4,8	15,2±2,6	128,7±17,7	15
»	26,4	49,4±4,1	19,4±4,1	Нет с вед.	7
14.06	26,4	76,2±8,2	15,4±1,9	123,3±11,2	9
»	26,5	105,9±12,1	19,3±3	122,7±10,2	12
»	26,6	123,9±8,8	18,6±1,6	104±6	10
»	26,7	141,1±6,5	22,5±3,6	109,5±7,7	10
19.06	26,5	131,4±23	11,6±5,8	101,6±10	5
»	27	327,1±10,9	18,5±1,6	83,6±1,9	35
25.06	27	461,2±18	24,2±2,7	67,2±2,3	39
1.07	27	477,2±26,7	23,6±4,4	59,4±1,8	11
»	27,5	552,1±22,5	18,4±3,4	57,5±2,8	9
»	28	617,2±48,3	18,6±6,2	57,1±4,6	5
5.07	28	466,6±17,3	20,1±2,9	70±2,3	8
»	30 _I	286±35,2	38,4±9	63,5±2,7	5
»	30 _{II}	302,8±7,4	41,2±6	58,6±1,3	13
»	30 _{все}	294,4±10,9	39,8±4,8	60±1,4	18
»	31	310,5±0,2	34,1±4,6	65,9±7,4	15
9.07	31	339,1±13,4	33,3±3,6	61,3±2,1	23

Таблица 3

**Митотическая активность эпителия роговицы сеголеток остромордой лягушки
в окрестностях медеплавильного комбината и на фоновых территориях**

Период развития	Дата отлова	n	Масса тела, мг	Индекс печени, ‰	МА
Водоем № 1					
А	25.06	28	375,1±8,4	Нет свед.	22,9±2,3
А	27.06	30	394±10,6	»	16,4±1,6
А	29.06	26	378,5±1,3	35,7±1,9	24,7±4
Б	6.07	28	351,4±12,8	27,1±1,1	17,5±1,8
Водоем № 2					
А	25.06	30	284,1±10,1	Нет свед.	18,6±2,7
А	29.06	29	260,5±11,3	30,4±1,6	17,0±1,3
Б	8.07	25	382,8±11,6	23,6±1,4	18±2
Водоем № 3					
А	27.06	30	483,1±19,6	Нет свед.	22,6±2,2
А	29.06	24	398,3±15,1	48,81±2,1	28,5±2
Б	9.07	30	407,9±23,3	27,1±1,7	23,5±1,5

Примечание: А – по окончании метаморфоза, Б – после роста на суше

Таблица 4

**Митотическая активность и размеры клеток эпителия роговицы сеголеток, развивавшихся
в пяти природных лесных водоемах**

№ водоема	Масса тела, мг	МА	Размер клетки, мкм ²	n
1	165,2±5,7	24,3±3,2	81,4±3,1	17
2	256,8±10,1	16,0±3,5	79,3±1,8	12
3	471,3±9,9	18,1±2,2	70,5±1,7	14
4	179,7±5,9	24,8±3,4	74,5±2,1	18
5	301,9±15,6	35,2±4,4	107,6±6,4	17

Таблица 5

**Митотическая активность и размеры клеток эпителия роговицы обыкновенной полевки в
техногенной и контрольных зонах**

Место отлова	МА	n	t	P
Окрестности комбината	32,3±6	40	-	-
Биостанция УрГу	47,4±2,4	74	2,331	0,02
Ильменский заповедник	50,2±6,1	33	2,096	0,05

бината (водоемы № 1, 2), в ана-телофазах обнаружены хромосомные перестройки в виде хромосомных мостов и фрагментов хромосом (это 10% животных в выборке из водоема № 1 от 27 июня и 12 % сеголеток от 8 июля, отловленных вблизи водоема № 2) Хромосомные перестройки у сеголеток остромордой лягушки в природных лесных водоемах ранее не наблюдали. Абберрантные сеголетки от общего количества проанализированных составляют менее 3 %. Таким образом, мы можем отметить высокую резистентность сеголеток остромордой лягушки к повреждающим химическим факторам среды.

Реакцию клеток млекопитающих на воздействие техногенного загрязнения изучали на примере обыкновенной полевки. Животные были отловлены весной и летом 1986 г. в 4-5 км от (месторасположения медеплавильного комбината против направления господствующих ветров. Контрольные, относительно чистые, участки располагались в Ильменском заповеднике (биостанция «Миассово») и неподалеку от биостанции УрГУ (Сысертский р-н). Декапитацию зверьков, вскрытие их и морфометрию органов проводили в лаборатории. Автор выражает благодарность Н. Ф. Черноусовой за предоставленную возможность исследовать отловленных ею животных.

На мышевидных грызунах показана связь между изменениями сезонными в морфофизиологии и соответствующими на тканевом уровне (Амстиславская, 1975). Эти данные мы учитывали при оценке влияния промышленных загрязнений на клеточное деление у полевок. По комплексу морфофизиологических показателей (массе тела, относительным размерам внутренних органов, величине гимуса, состоянию репродуктивных органов) выделили физиолого-функциональные группировки - ФФГ (Оленев, 1981, 1983). I - перезимовавшие зверьки (бывшая II ФФГ) — родоначальники популяций, созревают весной. II — несозревающие в год рождения сеголетки - представители последних и части первых когорт с низким уровнем обмена веществ: для них характерно состояние «законсервированной молодости» (по Шварцу), живут 13-14 мес, выполняют функцию переживания неблагоприятных условий зимы, служат основой популяции следующего года. III - половозрелые, размножающиеся сеголетки - представители первых когорт: характеризуются высоким уровнем обмена, высокой скоростью старения, живут 3-4 мес, выполняют функцию наращивания численности популяции.

У обследованных нами полевок обнаружены существенные различия на цитологическом уровне (табл. 5). Интенсивность клеточного деления в эпителиальной ткани животных, отловленных вблизи медеплавильного комбината, значительно ниже по сравнению с этим показателем у животных из фоновых территорий. Подавление клеточного деления под воздействием техногенного загрязнения выражено у животных I (майские выборки) и III ФФГ (июльские выборки) (табл. 6). Различия между выборками из чистых и загрязненных зон высоко достоверны ($P < 0,02$ и $0,002$ соответственно). Наибольшая устойчивость к повреждающему фактору отмечена у животных II ФФГ. В популяции полевок, обитающих в окрестностях медеплавильного комбината, выше процент зверьков с

абберациями хромосом в эпителиальных клетках (14 % животных, принадлежащих к I, и 10 % — к III ФФГ). Соответствующие показатели для контрольной зоны: 9,1 и 3,1 %. Аномалии представлены одиночными и множественными мостами, фрагментацией и отставанием хромосом в анафазе.

Таблица 5

Митотическая активность и размеры клеток эпителия роговицы обыкновенной полевки в техногенной и контрольных зонах

Место отлова	Физиолого-функциональные группировки					
	МА (I)	p	МА (II)	p	МА (III)	p
Окрестности комбината	27,8±9,7	-	44,6±17,5	-	23,3±6	-
	n = 7	-	n = 10	-	n = 8	-
Биостанция УрГУ	57,8±7,7	0,02	37,5±15,6	-	46,2±4,4	0,002
	n = 22	-	n = 6	-	n = 32	-
Ильменский заповедник	-	-	67,2±15,3	0,966	33,3±6,6	-
			n = 10		n = 23	

Таким образом, при использовании грызунов в качестве индикаторов промышленных загрязнений анализ целесообразно проводить с учетом функционального статуса обследуемых животных.

Заключение

Приведенные в сообщении результаты наблюдений за ростом и развитием личинок остромордой лягушки в окрестностях медеплавильного комбината и данные цитологического анализе свидетельствуют об относительной устойчивости этого вида к такому техногенному фактору, как химическое загрязнение. Однако известная способность лягушек накапливать большое количество токсических веществ в тканях может привести к передачи их дальше по цепи питания, усиливая таким образом экологический риск для экосистемы в целом (Любашевский и др., 1985).

В результате цитогенетического исследования грызунов обнаружены массивные нарушения хромосом в клетках эпителиальной ткани животных. Процент пораженных зверьков выше вблизи источника эмиссии, что свидетельствует о высокой мутагенной активности выбросов медеплавильного комбината и потенциальной генетической опасности для человека, существующей и условиях продолжающегося химического загрязнения среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславская Т. С. Митотическая активность покровного эпителия у сезонных генераций полевок *Clethrionomys*: Дис. ... канд. биол. наук. Свердловск, 1975.
- Ворошилин С., М., Плотко Э. Г., Гатиятуллина Э. З., Гилева Э. А. Цитогенетическое действие неорганических соединений фтора на клетки человека и животных // Генетика. 1973. № 4. С. 115—120.
- Ворошилин С. И., Плотко Э. Г., Никифорова В. Я. Мутагенное действие фтористого водорода на животных // Цитология и генетика. 1975. № 1. С. 42—44.

- Гилева Э. А., Плотко Э. Г., Гатиятуллина Э. З. О мутагенной активности неорганических соединений фтора // Гигиена и санитария. 1972. № 1. С. 9—12.
- Дабяган Н. В., Слепцова Л. А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. МЛ: Наука. 1976. С. 442—462.
- Епифанова О. И. Гормоны и размножение клеток. М.: Наука, 1965. 243 с.
- Заварзин А. А., Щелкунов С. И. Руководство по гистологии. Л.: Медгиз, 1954. 699 с.
- Иберт Д. Взаимодействующие системы в развитии. М.: Мир, 1968. 195 с.
- Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 645 с.
- Любашевский Н. М., Садыков О. Ф., Попов Б. В. и др. Техногенный фтор в лесных экосистемах Урала // Биохимическая экология и медицина. Свердловск, 1985. С. 234—272.
- Оленев Г. В. Популяционные механизмы приспособлений к экстремальным условиям среды (на примере рыжей полевки) // Журн. общ. биологии. 1981. Т. 2, № 4. С. 506—511.
- Оленев Г. В. Внутрипопуляционная изменчивость генерационной структуры рыжей полевки в разных биотопах // Морфофункциональные особенности внутрипопуляционных группировок животных. Свердловск, 1983. С. 12—22.
- Попов В. В. Исследования по морфогенезу роговицы у *Anura* // Уч. зап. Горьк. гос. ун-та. 1938. Вып. 8. С. 24—87.
- Роскин Г. И., Левинсон Л. В. Микроскопическая техника. М.: Изд-1.0 АН СССР, 1957. 467 с.
- Соколов В. Е., Кузнецов Г. В. Суточные ритмы активности млекопитающих. М.: Наука, 1978. 263 с.
- Стрелин Г. С. Влияние рентгеновых лучей на эпителий роговицы лягушки в связи с вопросом о действии лучистой энергии на митоз // Вестн. рентгенологии и радиологии. 1934. № 13. С. 98—114.
- Стрелин Г. С. О физиологическом градиенте. 1. Градиент реактивности эпителия роговицы лягушки и причины его возникновения // Арх. биол. наук. 1935. Т. 37, вып. 3. С. 4739.
- Терентьев П. В. Лягушка. М.: Изд-во АН СССР, 1950. 346 с.
- Sharma A., Taluk d e r G. Effects of Metals on chromosomes of Higher Organisms // Environ. Mutagen. 1987. V. 9, N 2. P. 191—226.