

УДК 574.3:591.05

ИНДУКЦИЯ МИКРОЯДЕР И ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ВИДОВ-ИНДИКАТОРОВ АНТРОПОГЕННО-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

Романова Е.Б., Шаповалова К.В., Рябинина Е.С.

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, e-mail: romanova@ibbm.unn.ru

Проведена дифференцированная оценка видов микроядер в эритроцитах крови и интенсивности окислительных реакций в сыворотке крови *Pelophylax ridibundus* и *P. lessonae*, обитающих в водоемах Нижегородской области. Показано, что наиболее часто встречались разрыхленные (23,6%) и прикрепленные микроядра (73,6%). Доля оформленных микроядер была небольшой (2,2%), а палочковидные микроядра (0,61%) обнаруживались не во всех выборках. Установлена сильная корреляционная взаимосвязь между количеством оформленных микроядер в крови лягушек и содержанием в водной среде железа ($r = 0,88$, $p = 0,021$), марганца ($r = 0,92$, $p = 0,009$), нитритов ($r = 0,86$, $p = 0,025$). В условиях загрязнения водоемов наблюдалось повышение интенсивности окислительной модификации белков. Полученные результаты свидетельствуют о существенных нарушениях цитогенетического и окислительного гомеостаза организма амфибий, подверженных воздействию урбанизации и загрязнению, указывают на экологическое неблагополучие среды обитания и расширяют теоретические представления о закономерностях изменения адаптивных реакций организма в условиях антропогенной нагрузки.

Ключевые слова: амфибии, окислительная модификация белков, микроядра

INDUCTION MICRONUCLEUS AND OXIDISING MODIFICATION OF PROTEINS OF SERUMS OF BLOOD THE SPECIES INDICATORS OF ANTHROPOGENOUS TRANSFORMED TERRITORIES

Romavova E.B., Shapovalova K.V., Ryabinina E.S.

National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevskiy, Nizhniy Novgorod, e-mail: romanova@ibbm.unn.ru

Assessment of the differentiated assessment of micronucleus species in erythrocytes intensity of oxidizing reactions in serums of blood of amphibians: *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae*, living in reservoirs of Nizhniy Novgorod region is carried out. It was shown that, most often in erythrocytes of frogs of all the populations studied, there were disintegrated micronucleus (23,6%) and attached micronucleus (73,6%). The proportion of rounded micronucleus (2,2%) was small, and in most cases, rod-shaped micronucleus (0,61%) were not detected. The moderate positive correlation was found between the increase of number of rounded micronuclei and the content of iron ($r = 0,88$, $p = 0,021$), manganese ($r = 0,92$, $p = 0,009$), nitrites ($r = 0,86$, $p = 0,025$) in the reservoir. In the conditions of pollution of reservoirs indicators of the oxidative modification of proteins of serum of blood increased. The obtained results indicate significant disturbances in the cytogenetic and oxidative homeostasis of the amphibian organism exposed to urbanization and pollution, point to the ecological disadvantage of the habitat and expand the theoretical understanding of the patterns of changes in the adaptive responses of the organism under conditions of anthropogenous load.

Keywords: amphibian, oxidative modification of proteins, micronucleus

В адаптации живых организмов к изменяющимся условиям среды участвует одна из ключевых гомеостатических структур – система крови, которой принадлежит решающая роль в неспецифических и специфических реакциях организма, определении его резистентности и реактивности. Удобными видами-индикаторами считаются амфибии, обладающие хорошо развитой нервной, иммунной, гематологической системами [1, 2] и тонко реагирующие на любые изменения в среде обитания. Известно, что под воздействием стрессорных факторов среды снижается жизнеспособность иммунокомпетентных клеток [3], активизируются процессы воспаления [4], повышается интенсивность окислительных процессов, связанных с генерацией активных форм кислорода и деструкцией белков [5]. При значительном объеме

исследований в области экологической физиологии практически отсутствуют работы по морфологическому анализу эритроцитов крови и реакциям окислительного метаболизма видов-индикаторов, обитающих в специфических условиях среды обитания. Между тем, в силу широкой природной распространенности белков и стабильности продуктов их окисления [6], механизмам цитогенетического и окислительного гомеостаза организмов уделяется повышенное внимание в связи с возрастающим прессом антропогенного воздействия на природные экосистемы.

Цель работы: оценка микроядер и интенсивности окислительных реакций в крови озерных (*Pelophylax ridibundus*) и прудовых лягушек (*P. lessonae*), обитающих на антропогенно-трансформированных территориях Нижегородской области.

Материалы и методы исследования

Материалом работы служили сборы озерных (*Pelophylax ridibundus*, Pallas, 1771) (80 особей) и прудовых (*Pelophylax lessonae*, Camerano, 1882) (40 особей) лягушек, обитающих в шести водоемах Нижегородской области, различающихся абиотическими условиями. Сбор амфибий осуществляли в течение полевого сезона 2017 года на водоемах: оз. Березовское (Нижегородская обл., Богородский р-н), (широта 43.622971731141, долгота 56.146989027575). Озеро часто посещается рыбаками, на расстоянии 500 метров от озера находится автостоянка. Река Кудьма у п. Ветчак (Нижегородская обл., Кстовский р-н), (широта 56.096735, долгота 44.314317). Основные загрязнители поступают в реку от предприятий г. Богородска и нефтеперерабатывающего завода г. Кстово. Оз. Силикатное (г. Н. Новгород, Сормовский р-н), (широта 56.370912, долгота 43.777608). Водоем создан искусственно на месте добычи песка для бетонных изделий ЗКПД-4. Глубина в озере достигает 20 м берег и дно песчаные, вода прозрачная. Заболоченности практически нет. Торфокарьер Ситниковского орнитологического заказника (далее – торфокарьер) (Нижегородская обл., Борский р-н), (широта 56.439791, долгота 44.072462). Представляет собой крупную систему водоемов выработанных торфяных месторождений разного типа. Болото п. Белкино (Нижегородская обл., Борский р-н), (широта 56.286208, долгота 44.548075). Низинное болото, расположено рядом с частными огородами и садами. Оз. Вторчермет (г. Н. Новгород, Московский р-н), (широта 56.311944, долгота 43.848889). Искусственный водоем, созданный на месте добычи грунта. Рядом проходит железная дорога, расположены массивы садов и гаражи, берега и прибрежная часть водоема захламплены бытовым мусором.

В прибрежной зоне водоемов были отобраны пробы воды, в которых с помощью спектрофотометра Nash DR-2800 определены химические загрязнители: железо общее, марганец, медь, хром, нитрат-ионы (NO_3^-), нитрит-ионы (NO_2^-), хлориды, сульфаты, сульфиды, нефтепродукты и водородный показатель (рН). По результатам анализа был произведен расчет удельного комбинаторного индекса загрязненности воды УКИЗВ [7] по формуле

$$S'_j = \frac{S_j}{N_j},$$

где S_j – комбинаторный индекс загрязненности воды в j -м створе; N_j – число учиты-

ваемых в оценке ингредиентов; S'_j – удельный комбинаторный индекс загрязненности воды в j -м створе.

У всех особей была взята кровь для определения количественного содержания эритроцитов (тыс/мм³), лейкоцитов (тыс/мм³) и приготовления мазков для оценки микроядерного теста. Подсчет микроядер [8] осуществляли на микроскопе Meiji Techno с использованием иммерсионного объектива при общем увеличении $\times 1500$, просматривая для каждой особи по 2 препарата, анализируя 1000 эритроцитов на препарат (40000 клеток на выборку). Дифференцировали четыре вида микроядер: 1 – оформленные; 2 – прикрепленные; 3 – палочковидные; 4 – разрыхленные. Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФ) с образованием альдегид-(АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) [5]. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрометре СФ-2000 при пяти длинах волн: 230, 270, 370, 430 и 530 нм. Расчет содержания 2,4-ДНФГ в сыворотке крови выражали в единицах оптической плотности на мл/сыворотки (ОЕ/мл).

Статистический анализ проводили непараметрическими методами в среде R-studio и программе STATISTICA 10.0 с расчетом критериев: Краскела – Уоллиса (H) (при множественном сравнении независимых групп по одному признаку); Данна (D) (множественный критерий при попарном сравнении групп), коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) (при анализе взаимосвязи) и по критерию z, при сравнении долей микроядер. Критический уровень значимости (p) принимали = 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Все исследованные водоемы Нижегородской области характеризовались повышенным содержанием загрязняющих веществ. Отметим высокое содержание в торфокарьере железа (1,4 мг/л), марганца (3,75 мг/л и сульфидов (22,5 мг/л). Воды р. Кудьмы характеризовались значительным загрязнением медью (9,5 мг/л) и нефтепродуктами (0,21 мг/л). В болоте п. Белкино отмечено высокое содержание железа (0,63 мг/л), марганца (2,4 мг/л), меди (0,17 мг/л) и хрома (0,089 мг/л). По индексу УКИЗВ исследованные водоемы в порядке возрастания расположились в следующем порядке: оз. Вторчермет (7,38, грязная, 4-ый класс, разряд «б») – оз. Силикатное (7,6,

грязная, 4-ый класс, разряд «б») – торфокарьер (8,1, очень грязная, 4-ый класс, разряд «в») – оз. Березовское (9,94, очень грязная, 4-ый класс, разряд «г») – болото п. Белкино (12,1 экстремально грязная, 5-ый класс) – р. Кудьма у п. Ветчак (18,47 экстремально грязная, 5-ый класс).

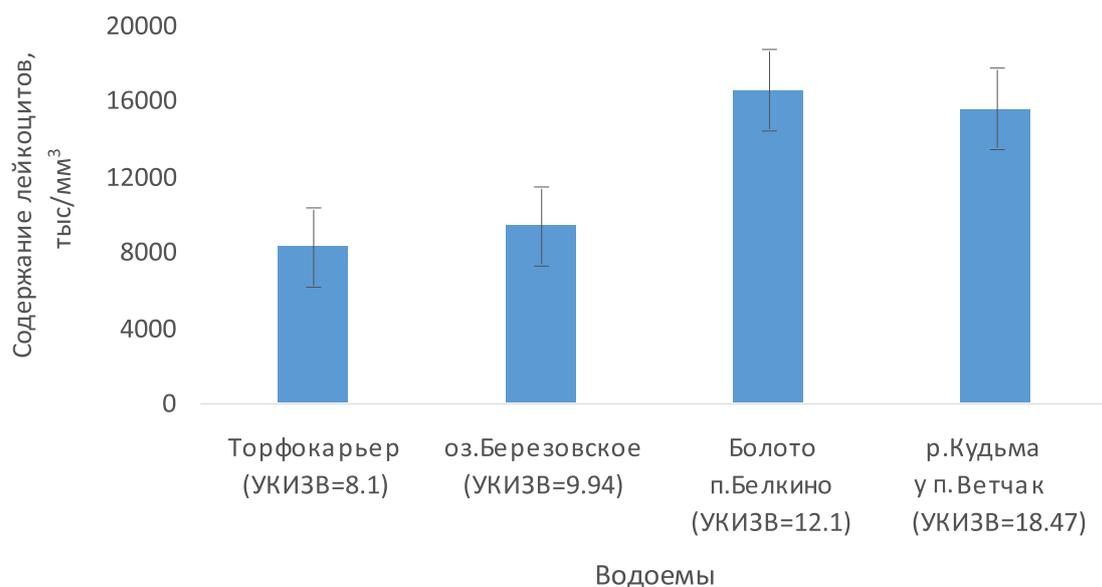
При анализе цитогематологических показателей у зеленых лягушек, обитающих в водоемах с высоким уровнем загрязнения (р. Кудьма и болото п. Белкино), выявлено снижение доли эритроцитов, что свидетельствовало об угнетении процессов кроветворения и возрастании содержания лейкоцитов (рисунок), имеющих, по-видимому, адаптивный характер.

Высоким содержанием микроядер в эритроцитах периферической крови характеризовались озерные лягушки, обитающие в оз. Березовское ($11,9 \pm 1,47/1000$ кл.), и прудовые лягушки оз. Вторчермет ($7,17 \pm 0,85/1000$ кл.). Низкое содержание микроядер характерно для популяций лягушек болота п. Белкино ($2,7 \pm 0,39/1000$) и торфокарьера ($3,7 \pm 0,49/1000$). Наиболее часто в эритроцитах периферической крови лягушек всех исследованных популяций встречались разрыхленные (23,6%) и прикрепленные микроядра (73,6%), доля оформленных микроядер (2,2%) выражена слабо, а палочковидные микроядра (0,61%) обнаруживались не во всех выборках лягушек. С помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмана выявлена сильная взаимосвязь, между количеством оформ-

ленных микроядер в крови лягушек и содержанием в водной среде обитания железа ($r = 0,88$, $p = 0,021$), марганца ($r = 0,92$, $p = 0,009$), нитритов ($r = 0,86$, $p = 0,025$). Установленным фактом является возрастание частоты возникновения микроядер и других ядерных аномалий в эритроцитах рыб после пребывания рыб в воде, содержащей тяжелые металлы: ионы хрома (VI), железа, меди и др. [9, 10]. Известно, что нитриты взаимодействуют с гемоглобином крови и окисляют в нем 2-валентное железо. В результате образуется метгемоглобин, который уже не способен переносить кислород. Это нарушает нормальное дыхание клеток и тканей организма (с развитием тканевой гипоксии), вследствие чего накапливаются молочная кислота, холестерин и снижается интенсивность синтеза белковых продуктов, в том числе белков тубулинов, входящих в состав микротрубочек веретена деления и отвечающих за процессы расхождения хромосом, что также приводит к индукции микроядер в эритроцитах.

Интенсификация свободнорадикального окисления белков выявлена в крови лягушек, обитающих во всех исследованных водоемах Нижегородской области (табл. 1).

У озерных лягушек установлена высокая чувствительность к окислению как для альдегидных (при 230 и 270 нм), так и кетонных карбонильных производных (370, 430 и 530 нм) белков сыворотки крови (табл. 2).



Содержание лейкоцитов (тыс./мм³) в крови амфибий, обитающих в специфических гидрохимических условиях среды, определенных величиной удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ)

Таблица 1

Содержание микроядер в эритроцитах и интенсивность окислительных реакций в крови амфибий, обитающих в водоемах Нижегородской области

Показатель	Водоемы					
	оз. Березовское (1)	р. Кудьма (2)	оз. Силикатное (3)	Торфокарьер (4)	Болото п. Белкино (5)	оз. Вторчермет (6)
Сумма микроядер	476/11,9*	117/2,92	168/4,2	148/3,7	108/2,7	287/7,17
	$z_{1-4} = 13,2; p = 0,015; z_{2-6} = 8,5; p = 0,0022; z_{1-2} = 14,8; p < 0,001; z_{1-3} = 12,2; p < 0,001; z_{1-5} = 15,3; p < 0,001; z_{2-4} = 1,9; p < 0,001; z_{3-5} = 3,6; p < 0,001; z_{3-6} = 5,6; p < 0,001; z_{4-5} = 2,5; p < 0,001; z_{4-6} = 6,6; p < 0,001; z_{5-6} = 9,1 p < 0,001$					
Суммарная ОМБ, ОЕ/мл	160,67 ± 1,11	184,22 ± 2,03	42,65 ± 2,04	23,47 ± 2,21	60,98 ± 1,39	170,62 ± 3,7
	$D_{1-3} = 4,09; p = 0,006; D_{1-4} = 5,82; p < 0,001; D_{2-3} = 6,75; p < 0,001; D_{2-4} = 8,47; p < 0,001; D_{2-5} = 5,1; p < 0,001; D_{3-6} = 5,44; p < 0,001; D_{4-5} = 3,38; p = 0,011; D_{4-6} = 7,17; p < 0,001; D_{5-6} = 3,75; p = 0,002$					

Примечание. * – в числителе: число эритроцитов с микроядрами в выборке, шт.; в знаменателе: доля клеток с микроядрами на 1000 эритроцитов; z – критерий сравнение долей; D – критерий Данна; p – уровень значимости, при множественных сравнениях производилась коррекция показателя с помощью поправки Холма.

Таблица 2

Показатели окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*)

Водоемы	Показатели ОМБ сыворотки крови, ОЕ/мл				
	230 нм	270 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Торфокарьер	11,99 ± 1,33	3,42 ± 0,51	3,61 ± 0,89	2,96 ± 0,94	1,49 ± 0,62
Оз. Силикатное	11,14 ± 0,56	11,92 ± 0,77	6,79 ± 0,33	5,87 ± 0,37	6,93 ± 1,58
Оз. Березовское	39,97 ± 0,75	36,01 ± 0,43	32,19 ± 0,61	29,79 ± 0,4	22,71 ± 0,69
Р. Кудьма	59,47 ± 0,56	41,93 ± 0,94	37,70 ± 1,26	35,71 ± 0,88	9,41 ± 0,35
Статистические показатели					
Критерий Крускала – Уоллеса (H)	H = 66,70 p < 0,001	H = 70,81 p < 0,001	H = 68,43 p < 0,001	H = 69,47 p < 0,001	H = 61,69 p < 0,001
Критерий Данна (D)	$D_{1-3} = 4,13, p = 0,0002; D_{1-4} = 6,85, p < 0,001; D_{2-3} = 4,03, p = 0,0003; D_{2-4} = 6,76, p < 0,001; D_{3-4} = 2,72, p = 0,039$	$D_{1-3} = 5,65, p < 0,001; D_{1-4} = 7,83, p < 0,001; D_{2-3} = 3,05, p = 0,014; D_{2-4} = 5,23, p < 0,001$	$D_{1-3} = 5,34, p < 0,001; D_{1-4} = 7,58, p < 0,001; D_{2-3} = 3,31, p = 0,006; D_{2-4} = 5,53, p < 0,001$	$D_{1-3} = 5,15, p < 0,001; D_{1-4} = 7,68, p < 0,001; D_{2-3} = 3,21, p = 0,008; D_{2-4} = 5,74, p < 0,001$	$D_{1-2} = 2,84, p = 0,027; D_{1-3} = 7,69, p < 0,001; D_{1-4} = 4,43, p < 0,001; D_{2-3} = 4,84, p < 0,001; D_{3-4} = 3,26, p = 0,007$

Примечание. Статистически значимое значение уровня значимости (p) приведено с учетом поправки Холма.

Таблица 3

Показатели окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови прудовых лягушек (*Pelophylax lessonae*)

Водоемы	Показатели ОМБ сыворотки крови, ОЕ/мл				
	230 нм	270 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Оз. Вторчермет	51,03 ± 2,44	39,04 ± 0,98	34,08 ± 1,09	29,88 ± 1,04	16,59 ± 1,1
Болото п. Белкино	15,06 ± 0,40	13,97 ± 0,38	12,60 ± 0,29	11,33 ± 0,70	8,02 ± 0,59
Критерий Манна – Уитни (U)	U = 5,40 p < 0,001	U = 5,40 p < 0,001	U = 5,41 p < 0,001	U = 5,40 p < 0,001	U = 4,46 p < 0,001

Примечание. Статистически значимое значение уровня значимости (p) приведено с учетом поправки Холма.

Результаты оценки окислительной модификации белков сыворотки крови прудовых лягушек выявили более интенсивное окисление у особой популяции амфибий, обитающих в оз. Вторчермет (г. Нижний Новгород, Московский район). Отметим, что интенсивность окисления альдегидных и кетонных карбонильных производных белков сыворотки крови у этих лягушек была выше в 2,5–3 раза, по сравнению с аналогичными показателями прудовых лягушек болота п. Белкино (табл. 3).

Установлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь суммарной ОМБ с содержанием в водоемах хлоридов ($r = 0,84$, $p = 0,036$) и сильная отрицательная взаимосвязь между интенсивностью окисления альдегидных (270 нм: $r = -0,91$, $p = 0,012$), кетонных карбонильных производных (370 нм: $r = -0,87$, $p = 0,023$; 430 нм: $r = -0,87$, $p = 0,025$; 530 нм: $r = -0,83$, $p = 0,043$) с содержанием железа. Можно полагать, что комплексное воздействие химических загрязнителей водной среды нарушает формирование сложных механизмов обеспечения гомеостатического равновесия в системе «организм – среда обитания», в том числе цитогенетическую стабильность, и окислительный баланс. Железо является металлом переменной валентности и участвует в катализируемом окислении белков. Механизм действия железа как тяжелого металла заключается в основном в стимуляции образования активных форм кислорода и в ингибировании активных групп ферментов, в том числе и антиоксидантных. Медь по своей химической природе сильнее связывается с органическими соединениями по сравнению с другими металлами. Ионы меди способны вытеснять функциональные металлы из ферментов и восстанавливать молекулярный кислород до активных форм кислорода. Эти свойства делают медь сильным токсикантом.

Полученные результаты свидетельствуют о существенных нарушениях цитоген-

нетического и окислительного гомеостаза, происходящих в организме амфибий, подверженных воздействию урбанизации и загрязнению, указывают на экологическое неблагополучие среды обитания и расширяют теоретические представления о закономерностях изменения адаптивных реакций организма в условиях антропогенной нагрузки.

Список литературы

1. Галактионов В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 528 с.
2. Романова Е.Б. Экологические аспекты организации иммунной системы амфибий / Е.Б. Романова, В.Ю. Николаев, Д.Б. Гелашвили // Современная герпетология. – 2014. – Т.14, вып. ¾. – С. 126–133.
3. Бродский И.Б. Микроядра как маркеры хромосомных изменений клеток / И.Б. Бродский, С.А. Брянцева, А.М. Ковалева // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2012. – № 1. – С. 86.
4. Романова Е.Б. Иммунофизиологические характеристики популяций зеленых лягушек урбанизированной территории / Е.Б. Романова, В.Ю. Николаев // Изв. Самарского научного центра РАН. – 2014. – Т. 16, № 5(1) – С. 616–622.
5. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. – СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006. – 400 с.
6. Муравлева Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клоев и др. // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74–78.
7. Смирнова В.М. Метод комплексной оценки загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям. Определение удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ) и класса качества воды / В.М. Смирнова., И.С. Макеев, А.В. Благодаткин. – Нижний Новгород, 2011. – 19 с.
8. Жулева Л.Ю. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области / Л.Ю. Жулева, Н.П. Дубинин // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 7. – С. 999–1004.
9. Крюков В.И. Индукция микроядер в эритроцитах карпа ионами шестивалентного хрома / В.И. Крюков, А.Л. Климов, Н.В. Красова // Инновационная наука. – 2016. – № 9. – С. 379.
10. Кузина Т.В. Образование микроядер в эритроцитах промысловых рыб Волго-Каспийского канала / Т.В. Кузина // Естественные науки. – 2010. – № 4 (33) – С. 124–129. URL: <http://asu.edu.ru/images/File/Izdatelstvo/EN4/124-129.pdf>.