

УДК 574.3.591

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО СОДЕРЖАНИЮ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАРНЫХ КЛЕТКАХ ПРУДОВЫХ ЛЯГУШЕК, ОБИТАЮЩИХ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ ВОДНОЙ СРЕДЕ**

***Е.Б. Романова, Е.С. Рябинина***

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им.*

*Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

В настоящее время активно исследуются цитогенетические и гематологические особенности клеток эритроидного ряда у представителей различных классов животных, в том числе, амфибий. Характерными чертами кроветворения амфибий являются: 1) различная локализация и специализация кроветворных участков у разных представителей; 2) диффузный характер кроветворения и интраваскулярное (в циркулирующей крови) протекание; 3) отсутствие деления на лимфоидное и миелоидное кроветворение (Гольберг и др., 1973). Активность работы органов гемопоэза амфибий (костного мозга, селезенки, печени) (Хамидов и др., 1978) определяется сезоном года. Известно, что весной эритроидные клетки начинают свою дифференцировку в костном мозге, затем продолжают в кровотоке, летом же эритропоэз смещается в кровоток (Акуленко, 2011).

Эритроцитарный ряд клеток (эритрон) (Castle, Minot, 1936) амфибий, берет свое начало от полипотентных стволовых клеток и включает ряд стадий: эритробласты, нормобласты (базофильные, полихроматофильные, оксифильные) и зрелые эритроциты (Чертков, Фриденштейн, 1977). По сравнению с млекопитающими эритроциты амфибий дольше сохраняют синтетическую активность в процессе созревания и в гемопоэтических очагах выявляются все стадии митоза дифференцирующихся эритроидных клеток, с максимальной частотой в полихроматофильных нормобластах (Charlemagne, 1972). В зрелых эритроцитах амфибий встречается и амитотическое деление (Хамидов и др., 1978). В результате неправильного хода клеточного деления или фрагментации ядра в процессе апоптоза, образуются микроядра – фрагменты ядра в эукариотической клетке, не содержащие полного генома. Микроядра образуются из ацентрических хромосомных или хроматидных фрагментов (кластогенный эффект) и целых хромосом или хроматид, которые отстают в анафазе и остаются вне дочерних ядер в телофазе (анеугенный эффект) (Catalan et al., 2000; Falck et al., 2002). Отстающие участки не могут двигаться к полюсам, поскольку оторваны от митотического веретена (Norppa, Falck, 2003), что и приводит к образованию микроядра в дочерней клетке. Различие между этими двумя механизмами, определяющими происхождение микроядер, очень важно (Norppa et al., 1993).

Учет микроядер (микроядерный тест) является относительно новым, но уже общепринятым цитогенетическим методом оценки мутагенного действия агентов различной природы. Особенно удобно наблюдать за микроядрами, локализованными в крупных ядерных эритроцитах амфибий (Крюков, 2000; Манских, 2006; Романова и др., 2018; Do Amaral et al., 2019; Yu Ma and etc., 2019 и др.). Согласно литературным данным, частота встречаемости микроядер в полихроматофильных эритроцитах млекопитающих, как правило, существенно выше (Ковалева, 2008), хотя в отдельных работах таких отличий не обнаружено (Ciet et al., 1993). Сравнительный анализ частоты встречаемости микроядер в эритроциты амфибий ранее не проводился, между тем при оценке генотоксического воздействия экологических факторов вопрос соотношения юных и зрелых форм эритроцитов с микроядрами весьма актуален.

**Цель работы:** оценка доли эритроцитарных клеток с микроядрами в костном мозге и периферической крови прудовых лягушек (*Pelophylax lessonae*, Cramerano 1882) урбанизированной территории Нижегородской области, собранных в течение полевых сезонов 2017–2018 гг.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор прудовых лягушек (80 особей) осуществляли в течение полевых сезонов 2017–2018 гг., на территории двух водных объектах. Первый: низинное болото п. Белкино (Нижегородская обл., Борский р-н, с.ш. 56.2862, в.д. 44.5480), расположен в 60 км от г. Нижнего Новгорода, рядом располагаются жилые дома и частные огороды, вокруг произрастает смешанный лес, местными жителями не посещается. Второй: оз. Вторчермет, искусственный водоем, созданный на месте добычи грунта (г. Н. Новгород, Московский р-н, с.ш. 56.3119, в.д. 43.8488), находится в промышленной части города с множественной застройкой, в зоне влияния ОАО «Вторчермет».

В водоемах в прибрежной зоне были отобраны пробы воды, в которых, с помощью спектрофотометра Nach DR-2800, определены химические загрязнители: железо общее, марганец, медь, хром, нитрат-ионы ( $\text{NO}_3$ ), нитрит-ионы ( $\text{NO}_2$ ), свинец, никель, цинк, сульфаты, сульфиды и водородный показатель (рН). По результатам анализа рассчитывали УКИЗВ (удельный комбинаторный индекс загрязненности воды) (Смирнова и др., 2011).

Для цитогематологического анализа от каждой особи были получены и окрашены мазки крови и костного мозга (Гематология, 2004). Подсчет микроядер и их дифференцировку: 1-оформленные; 2-прикрепленные; 3-палочковидные; 4-разрыхленные (Жулева, Дубинин, 1994 с модификациями), осуществляли на микроскопе Meiji Techno с использованием иммерсионного объектива при общем увеличении  $\times 1500$ . Окуляр микрометром проводили измерение большой (2a) и малой (2b) оси каждого микроядра и рассчитывали его площадь ( $\text{мкм}^2$ ) по формуле эллипса:  $S = \pi ab$ , где a – большая полуось эллипса, b – малая полуось эллипса,  $\pi = 3.14$ .

Статистический анализ проводили непараметрическими методами с расчетом критериев: Уилкоксона (W); Дана (D), Манна-Уитни (Z), критерия z – при сравнении долей. Критический уровень значимости (a) принимали = 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференцированный подсчет микроядер выявил их наличие, как в молодых, так и зрелых эритроцитах. В обеих выборках все четыре вида микроядер встречались только в зрелых эритроцитах крови (2017 год). В 2018 году палочковидные микроядра в эритроцитарных клетках разной зрелости не обнаружены.

В нормобластах костного мозга прудовых лягушек оз. Вторчермет преобладали микроядра оформленного вида, доли прикрепленных и разрыхленных в динамике двухлетних наблюдений менялись незначительно. Суммарная доля микроядер в эритроцитарных клетках костного мозга прудовых лягушек оз. Вторчермет оставалась высокой: в 2017 –  $(9.5 \pm 1.55 \%)$ , в 2018 –  $(5.12 \pm 1.15 \%)$  (рис. 1).

Иное соотношение видов микроядер в эритроцитарных клетках костного мозга наблюдалась в выборке прудовых лягушек бол. Белкино. В 2017 г. в костном мозге лягушек встречались только эритроциты с оформленными микроядрами, в 2018 г. были обнаружены два типа микроядер, при этом эритроциты с микроядрами прикрепленного вида преобладали над эритроцитами с оформленными микроядрами. Суммарная доля микроядер статистически значимо выросла в 2018 году по сравнению с предыдущим годом ( $W = 2.93$ ;  $p = 0.003$ ).

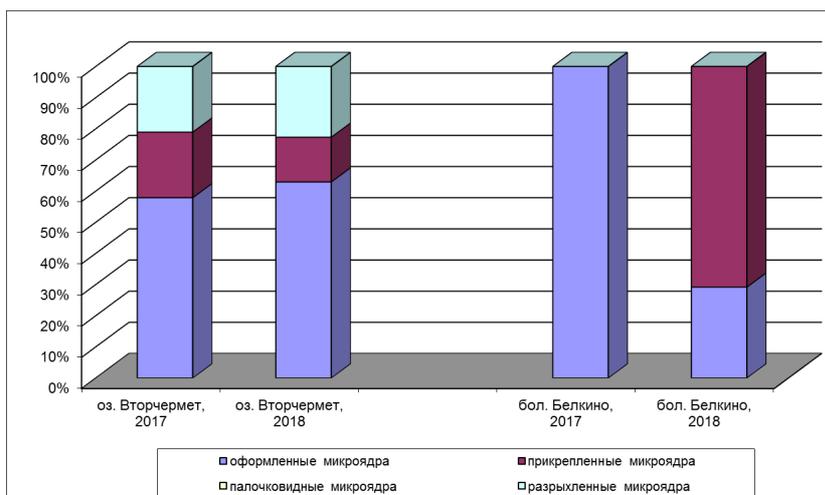


Рис. 1. Доли микроядер разных видов в эритроцитарных клетках костного мозга прудовых лягушек

Доля микроядер в более зрелых эритроцитах, циркулирующих в крови прудовых лягушек популяции оз. Вторчермет, в отличие от нормобластных клеток костного мозга, в 2018 году по сравнению с 2017 годом увеличивалась ( $W = 3.5$ ;  $p < 0.001$ ), за счет доли прикрепленных микроядер ( $W = 3.75$ ;  $p = 0.0001$ ) на фоне уменьшения доли разрыхленных микроядер ( $W = 3.4$ ;  $p = 0.0006$ ) (рис. 2). При этом отметим в этой выборке в 2018 году почти трехкратное превышение доли микроядер в зрелых эритроцитах крови по сравнению с эритроцитарными клетками костного мозга ( $W = 4.28$ ;  $p < 0.001$ ).

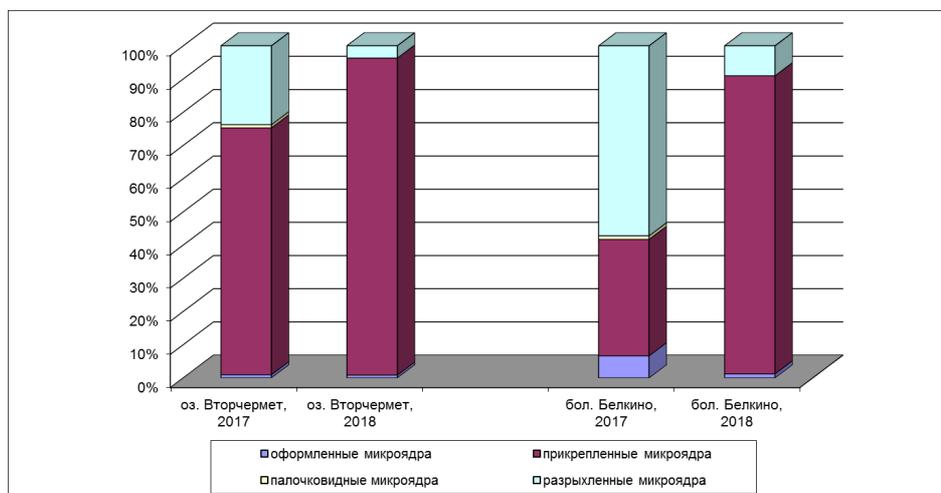


Рис. 2. Доли микроядер разных видов в эритроцитах периферической крови прудовых лягушек

В эритроцитах периферической крови прудовых лягушек бол. Белкино в 2018 году происходило общее увеличение суммарной доли микроядер по сравнению с 2017 ( $W = 4.57$ ;  $p < 0.001$ ), за счет появления прикрепленных видов ( $W = 2.38$ ;  $p = 0.017$ ). В этой выборке встречаемость микроядер в эритроцитах периферической крови была выше, чем в эритроцитарных клетках костного мозга, как в 2017 г. ( $W = 4.07$ ;  $p = 0.001$ ), так и в 2018 г. ( $W = 1.96$ ;  $p = 0.04$ ).

Ранее нами было выявлено отсутствие различий в размерных характеристиках микроядер конкретного вида в поли- и нормохроматофильных эритроцитах (Romanova, Ryabinina, 2018), что подтвердилось и в настоящем исследовании. Так, например, разрыхленные микроядра в эритроцитах костного мозга и периферической крови прудовых лягушек оз. Вторчермет имели сопоставимую среднюю площадь, в  $\mu\text{m}^2$ : в 2017 г.: ( $7.04 \pm 1.12$ ) и ( $7.44 \pm 0.68$ ), соответственно,  $Z = 0.66$ ;  $p = 0.5$ ; в 2018 г.: ( $8.97 \pm 3.58$ ) и ( $7.71 \pm 0.95$ ), соответственно,  $Z = 0.07$ ;  $p = 0.94$ .

Наиболее крупными были разрыхленные микроядра, самыми мелкими – прикрепленные микроядра. Так, средняя площадь прикрепленных микроядер в эритроцитах крови прудовых лягушек бол. Белкино составляла:  $(1.19 \pm 0.34)$  мкм<sup>2</sup>, в 2017 г. и  $(1.14 \pm 0.03)$  мкм<sup>2</sup>, в 2018 г. ( $W = 0.53$ ;  $p = 0.59$ ). Отметим, что размерные характеристики прикрепленных микроядер эритроцитов крови озерных лягушек оз. Вторчермет статистически значимо превышали аналогичный показатель особей бол. Белкино, в 2017 ( $D = 3.45$ ,  $p = 0.0005$ ), и в 2018 г. ( $D = 2.23$ ,  $p = 0.025$ ).

Из литературных источников известно, что маленькие микроядра возникают в основном из ацентрических фрагментов, тогда как большие – из дицентриков или целых хромосом (Pincu, 1985). Дицентрики имеют содержание ДНК в диапазоне от 5 до 15 % от содержания ДНК в ядре G1 (Nusse, Kramer, 1984). По нашим данным прикрепленные микроядра имеют наименьший размер, можно полагать, что в них содержится лишь фрагмент ДНК.

Анализ данных литературы и собственные полученные результаты позволяют заключить, что причины, определяющие нарушения процесса деления и приводящие к образованию микроядер, могут быть связаны с факторами, обладающими статокинетическим действием (задерживающими и вызывающими нарушения в фазах митоза, связанных с формированием веретена деления и расхождением хромосом). Например, воздействием тяжёлых металлов и других загрязнителей водной среды (Кармазин, Пескова, 2010; Игнатова и др., 2016; Carvalho et al., 2019), действием ионизирующего излучения (Красавин и др., 2004; Башлыкова, 2017), паразитарными инвазиями (Бекиш и др., 2003; Побяржин, Бекиш, 2003) шумовое, физическое и другие виды воздействий и др.

Согласно проведенному гидрохимическому анализу, качество вод водных объектов в наблюдаемый период характеризовалось IV–V (грязная – очень грязная – экстремально грязная). Несмотря на то, что состояние вод оз. Вторчермет, согласно УКИЗВ (табл. 1) по сравнению с 2017 годом незначительно улучшилось: снизилась концентрация марганца (в 4 раза), меди (в 1.3 раза), сульфидов (в 19 раз), высокая частота микроядер в клетках эритроцитарного ряда указывает на эколого-генетическое неблагополучие водной среды и иллюстрирует суммарный ответ организма на комплексное загрязнение окружающей среды (химическое, физическое, биологическое и пр.).

Таблица 1 Гидрохимический анализ загрязненности воды исследуемых водоемов

Водоемы	Год	УКИЗВ, отн. ед.	Класс качества воды
оз. Вторчермет	2017	9.1	IV, очень грязная, разряд «в»
	2018	6.6	IV, грязная, разряд «б»
Бол. п. Белкино	2017	12.1	V, экстремально грязная
	2018	12.5	V, экстремально грязная

Результаты гидрохимического анализа проб воды бол. Белкино в 2018 году показали возрастание концентрации железа (увеличение концентрации в 3 раза по сравнению с 2017 годом) и концентрации меди (в 2.1 раза), существенно превышающие ПДК<sub>рыб.хоз</sub>, что отразилось на повышении индекса загрязненности вод.

Подводя итог анализу цитогенетических нарушений в эритроцитарных клетках прудовых лягушек, длительно обитающих в загрязненной водной среде на урбанизированной территории, можно заключить, что наиболее неблагоприятна экологическая ситуация в оз. Вторчермет, что подтверждается возрастанием доли микроядер в течение периода наблюдений ( $z = 9.1$ ;  $p < 0.001$ ). Ряд исследователей относят оформленные ядра к естественным (фоновым) микроядрам для данного вида животных, образование которых связано с нарушениями веретена деления клетки (Жулева, Дубинин, 1994). Изучаемое генотоксическое воздействие может индцировать образование только одного вида микроядер, и другие виды могут быть неинформативными для анализа (Norppa, Falck, 2003). Полагаем, что к наиболее информативным видам микроядер, иллюстрирующих цитогенетическое неблагополучие водной среды, следует отнести прикрепленные микроядра, являющиеся результатом структурных нарушений хромосом. Кроме того, ряд генотоксинов может изменять соотношение юных и зрелых форм эритроцитов, которые гибнут быстрее, что существенно влияет на оценку цитогенетического воздействия. В этой связи отметим, что количество микроядер существенно варьирует в зависимости от анализируемой гемопоэтической ткани, что и диктует целесообразность оценки нестабильности генома методом анализа микроядер, как и полихроматофильных (молодых), так и нормохроматофильных (более зрелых) эритроцитарных клетках амфибий.

ЛИТЕРАТУРА

- Акуленко Н.М. Сосудистое русло как часть гемопозитической системы бесхвостых амфибий // Вестник зоологии. 2011. Т. 43, №. 4. С. 359–366.
- Башлыкова Л.А. Наследование цитогенетических и молекулярно-клеточных эффектов в клетках костного мозга животных при хроническом воздействии ионизирующего излучения // Известия Самарского научного центра РАН. 2017. Т. 19 № 2(3). С. 420–425.
- Бекиш В.Я., Колмогоров В.И., Побяржин В.В. Микроядерный тест в клетках мозга и семенников мышей линии СВА при гельминтозах // Вестник ВГМУ. 2003. Т. 2, №. 2. С. 67–72.
- Гематология. Новейший справочник / Под ред. К.М. Абдулкадырова. СПб.: Изд-во Сова, 2004. 928 с.
- Гольдберг Д.И. Гематология животных. Томск: Изд-во ТГУ, 1973. 182 с.
- Жулева Л.Ю., Дубинин Н.П. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области // Генетика. 1994. Т. 30, № 7. С. 999–1004.
- Игнатова И.В., Епринцев С.А., Калаев В.Н. и др. Оценка состояния среды водных экосистем в районе крупных горнодобывающих предприятий (на примере Павловского горно-обогатительного комбината) // Современные проблемы науки и образования. 2016. №. 6. С. 573–583.
- Кармазин А.П., Пескова Т.Ю. Использование гематологических показателей озерной лягушки *Rana ridibunda* (Pallas 1771) для определения зоны токсического действия нефти // Современная герпетология. 2010. Т. 1, №. ½. С. 3–7.
- Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. 2008. № 1. С. 58–72.
- Красавин Е.А., Говорун Н.Л., Шмакова И.В. и др. Генетическое действие излучений с разными физическими характеристиками на клетки человека и млекопитающих // Физика элементарных частиц и атомного ядра. 2004. Т. 35, №. 6. С. 1–30.
- Крюков В.И. Модифицирование импульсным электромагнитным полем индуцируемых свинцом частот микроядер в эритроцитах личинок бесхвостых амфибий // Экология. 2000. № 3. С. 238–240.
- Манских В.Н. К вопросу о механизмах образования микроядер в соматических клетках бесхвостых амфибий в норме и при действии N-нитрозо-N-метилкарбамида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 141, №. 2. С. 217–220.
- Петров Р.В. Иммунология. М: Медицина. 1982. 308 с.
- Побяржин В.В., Бекиш В.Я. Нарушения в геноме хозяина при экспериментальном гименолепидозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала при заражении // Вестник ВГМУ. 2003. Т.3, №. 4. С. 85–89.
- Романова Е.Б., Шаповалова К.В., Рябинина Е.С. Лейкоцитарный состав крови и микроядра в эритроцитах амфибий загрязненных водных объектов Нижегородской области // Принципы экологии. 2018. № 2. С. 125–139.
- Смирнова В.М., Макеев И.С., Благодаткин А.В. Метод комплексной оценки загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям. Определение удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ) и класса качества воды. Нижний Новгород, 2011. 19 с.
- Хамидов Д.Х., Акилов А.Т., Турднева А.А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. Ташкент: Фан, 1978. 168 с.
- Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворения (кроветворные клетки-предшественники). М.: Медицина, 1977. 274 с.
- Pincu M, Callisen H, Norman A. DNA content of micronuclei in human lymphocytes / Int. J Radiat Biol. 1985. Vol. 47. P. 423–432.
- Carvalho W.F., Ruiz de Arcaute C., Perez-Iglesias J.M. et al. DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles // Ecotoxicology. 2019. Vol. 28. P. 367–377.
- Castle W., Minot G. Pathologic physiology and clinical description of the anemia. Oxford University Press. N.Y., 1936. 132 p.
- Catalan J., Falck G.C. M., Norppa H. The X chromosome frequently lags behind in female lymphocyte anaphase // Am. J. Hum. Genet. 2000. Vol. 66. P. 687–691.
- Charlemagne J. Methodological Aspects of the differentiation of blood elements in the Axolotl *Ambystoma mexicanum* Shaw // Z. Zellforsch. 1972. Vol. 123. P. 224–239.
- Cliet I., Melcion C., Cordier A. Lack of productivity of bone marrow micronucleus test versus testis micronucleus test: comparison with four carcinogens // Mutat. Res. 1993. Vol. 292. P. 105–111.
- Do Amaral D.F., Guerra V., Gonçalves A., et al. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: A critical review // Science of the Total Environment. 2019. Vol. 686. P. 332–344.
- Falck G.C. M., Catalan J., Norppa H. Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes // Mutagenesis. 2002. Vol. 17 (2). P. 111–117.
- Norppa H., Falck G.C. M. What do human micronuclei contain? // Mutagenesis. 2003. Vol. 18 (3). P. 221–223.
- Norppa H., Luomahaara S., Heikanen H. et al. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens // Environmental Health Perspectives Supplements. 1993. Vol. 101 (3). P. 139–143.
- Nusse M, Kramer J. Flow Cytometric Analysis of Micronuclei Found in Cells After Irradiation // Cytometry. 1984. Vol. 5. P. 20–25.
- Romanova E.B., Ryabinina E.S. Cytogenetic Approach to Primary Assessment of Habitat Quality // Opera Med Physiol. 2018. Vol. 4 (1). P. 19–22.
- Yu Ma, Bo Li, Yang Ke, Yu Hui. Zhang Effects of low doses Trichlorfon exposure on *Rana chensinensis* tadpoles // Environmental Toxicology. 2019. Vol. 34. P. 30–36.