

УДК 574.24: 591.85

## МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК РОДА *RANA* В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ

© 2010 г.

Е.Б. Романова

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

ecology@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 30.05.2009

Проведено определение иммуногематологических показателей и стабильности развития по показателю флуктуирующей асимметрии выборок из популяций зеленых лягушек рода *Rana*, обитающих в водоемах г. Нижнего Новгорода и Нижегородской области. Показано возрастание нарушений иммунологического гомеостаза по мере увеличения антропогенной нагрузки на водную экосистему.

*Ключевые слова:* иммуногематологические показатели, иммунная система.

Для выявления наличия и определения степени воздействия антропогенного загрязнения используют методы биоиндикации с оценкой морфологических, гематологических, цитогенетических и иммунологических характеристик состояния живых организмов – индикаторных видов [1–3]. Одним из наиболее доступных и удобных биоиндикаторов считаются амфибии [4]. Эти животные, обитая в городских водоемах, реагируют активными и микроэволюционными преобразованиями и демонстрируют реакции на весь спектр экологических факторов, характерных для данной экосистемы.

Цель настоящей работы – оценка стабильности развития популяций зеленых лягушек рода *Rana* урбанизированных ландшафтов с использованием иммунологических и морфогенетических подходов.

### Материалы и методы

В качестве объекта были использованы фоновые виды бесхвостых амфибий: зеленые лягушки рода *Rana* (*Rana lessonae* Camerano – лягушка прудовая, *Rana ridibunda* P. – лягушка озерная) (всего 970 особей). Качество среды городских водоемов, расположенных в заречной части г. Нижнего Новгорода (8 водоемов) и Нижегородской области (7 водоемов), оценивали по стабильности развития амфибий, мерой которой служит величина флуктуирующей асимметрии (ФА) [1, 2]. Степень отклонения качества среды от нормы оценивали по пятибалльной шкале [5]. Массы тела амфибий определяли на технических весах с точностью до 0.02 г (ошибка измерения  $\pm 0.01$ ), а размеры лимфоидных органов (тимуса и селезенки) – на торсионных весах Waga Torsyjna-WT с точно-

стью до 0.1 мг (ошибка измерения  $\pm 0.03$ ). Индекс (относительный размер) органов вычисляли в промилле (‰), т.е. как отношение массы органа (мг) к массе тела (г) [6]. Гематологические и иммунологические показатели оценивали общепринятыми в лабораторной практике методами [7, 8].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием непараметрических (коэффициент ранговой корреляции Спирмана, критерий Крускала – Уоллеса, критерий Манна – Уитни, критерий Фридмана) методов математической статистики, реализованных в пакете прикладных программ «Statistika» v.6.0 [9].

Для интегральной характеристики состояния организма амфибий применяли обобщенную функцию желательности [10–14]:

$$D = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n d_i} = \sqrt[n]{d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \dots d_n},$$

где  $D$  – обобщенная функция желательности;  $d_1, d_2, \dots, d_n$  – частные функции желательности.

С учетом рекомендаций [15], вычисление частных функций желательности проводили по формулам, позволяющим учесть увеличение/снижение («желательность/нежелательность») данного показателя и перевести полученную экспериментальную информацию в оценочную категорию. Величина обобщенной функции желательности служила интегральной мерой отклонения состояния организма от условно оптимального (наилучшего) значения, принятого за 1.

### Результаты и их обсуждение

На основе результатов измерений величины флуктуирующей асимметрии меристических признаков зеленых лягушек по комплексу из 11

билатеральных признаков окраски были получены значения величины ФА для каждой выборки и установлено, что популяции амфибий урбанизированной территории характеризовались возрастанием интегрального показателя. Проведенная оценка уровня стабильности животных по величине ФА позволила также распределить все исследованные экосистемы на пять обобщенных групп, в соответствии со шкалой балльной оценки качества среды обитания. Средневзвешенное значение величины ФА для каждой обобщенной группы составило:

- 1 группа – I балл качества среды –  $0.45 \pm 0.0014$ ;
- 2 группа – II балл качества среды –  $0.51 \pm 0.0006$ ;
- 3 группа – III балл качества среды –  $0.57 \pm 0.0014$ ;
- 4 группа – IV балл качества среды –  $0.62 \pm 0.0007$ ;
- 5 группа – V балл качества среды –  $0.67 \pm 0.0015$ .

Таким образом, ухудшение качества среды обитания вызывало возрастание нестабильности развития организма амфибий.

Иммуногематологический анализ показал, что в условиях возрастания среднего стресса происходит снижение количества лейкоцитов в периферической крови популяций амфибий, при этом была установлена отрицательная корреляция величины ФА и общего числа лейкоцитов в периферической крови лягушек. Уравнение регрессии, аппроксимирующее линейную зависимость анализируемых показателей, имело вид:  $y = 72.616 - 84.289x$ ; ( $R^2 = 0.65$ ;  $r = 0.80$ ;  $p < 0.001$ ). Возрастание нестабильности развития сопровождалось повышением количества

агранулоцитов и снижением всех форм гранулоцитов в периферической крови зеленых лягушек. Анализ зависимости количества лимфоцитов периферической крови от величины флуктуирующей асимметрии показал, что примерно на 58% (коэффициент детерминации  $R^2 = 0.58$ ) дисперсия количества лимфоцитов может быть объяснена дисперсией величины ФА. Коэффициент корреляции Спирмана между этими показателями составил  $r = 0.76$ ;  $p = 0.0001$ , что свидетельствовало о прямой связи анализируемых признаков.

Результаты исследования морфофизиологических показателей лимфоидных органов (тимуса и селезенки) указывали на перестройку баланса их клеточных компонентов в разных условиях среды. При этом выявлено возрастание количества низкодифференцированных лимфоцитов (нулевых клеток) в тимусе амфибий при ухудшении качества среды обитания животных.

Сравнение анализируемых популяций амфибий по средневзвешенным величинам основных иммуногематологических показателей (количеству лейкоцитов, нейтрофильных гранулоцитов, эозинофильных гранулоцитов Т- и В-лимфоцитов в периферической крови, тимоцитов и В-лимфоцитов в селезенке) с помощью критерия Фрийдмана ( $\chi^2 = 11.00$ ;  $N = 6$ ;  $p = 0.01173$ ) выявило статистически значимые различия между популяциями.

С целью объединения показателей иммунного гомеостаза организма амфибий, использова-

Таблица

**Оценка состояния популяций амфибий, обитающих в водоемах разного качества среды, по средневзвешенным показателям иммунного статуса и уровня стабильности развития, с помощью функции желательности**

№	Показатель	Вид показателя	Группы амфибий				
			1 группа (I балл качества среды)	2 группа (II балл качества среды)	3 группа (III балл качества среды)	4 группа (IV балл качества среды)	5 группа (V балл качества среды)
1	Нейтрофильные гранулоциты	%	15.67	13.78	16.56	13.32	13.68
		$d_i$	0.998	0.983	1.000	0.976	0.982
2	Эозинофильные гранулоциты	%	7.53	10.01	10.66	6.16	6.06
		$d_i$	0.977	0.888	0.861	0.999	1.000
3	Общее количество лейкоцитов	тыс/мм <sup>3</sup>	38.52	26.20	29.29	27.70	26.89
		$d_i$	1.000	0.930	0.963	0.948	0.938
4	Лимфоциты	%	67.66	65.28	57.56	73.95	74.07
		$d_i$	0.987	0.992	1.000	0.969	0.969
5	Моноциты	%	2.18	1.83	2.41	4.02	3.20
		$d_i$	0.985	1.000	0.936	0.754	0.862
6	Индекс тимуса	отн. ед.	0.09	0.17	0.22	0.20	0.14
		$d_i$	1.000	0.827	0.700	0.748	0.909
7	Индекс селезенки	отн. ед.	0.60	0.59	0.47	0.59	2.02
		$d_i$	0.970	0.74	1.000	0.974	0.441
Обобщенная функция желательности, $D$			0.988	0.940	0.920	0.903	0.845

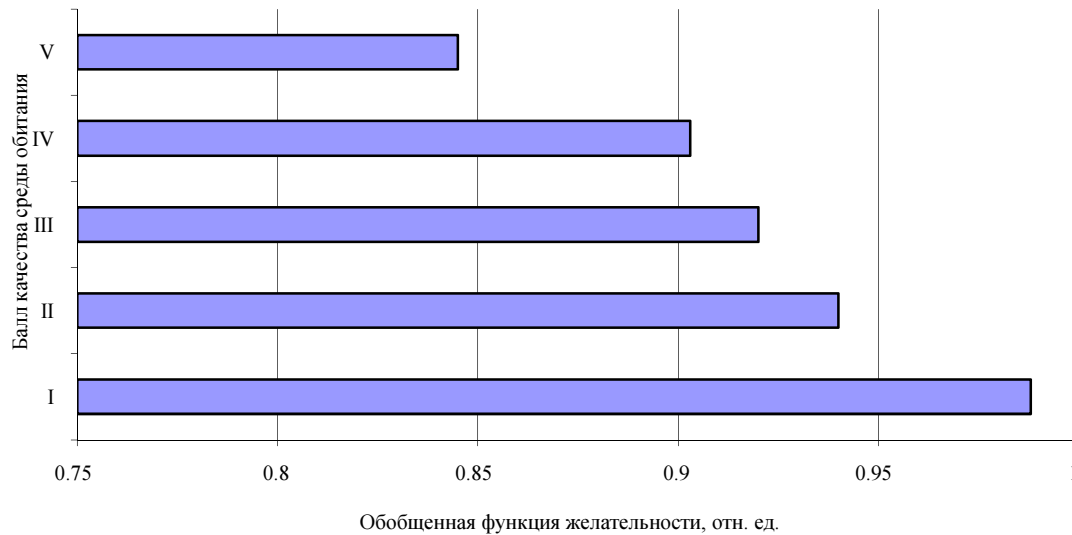


Рис. Оценка состояния популяций амфибий, находящихся в разных качественных условиях среды, по иммунологическим показателям, с построением функции желательности

ли обобщенную функцию желательности. Вначале были вычислены значения частных функций желательности ( $d_i$ ) для семи показателей, определенных для всех групп. Затем рассчитали обобщенную функцию желательности ( $D$ ) для пяти объединенных групп (таблица). Использование метода функции желательности позволило объединить по единому принципу все полученные экспериментальные показатели и оценить состояние природных популяций. Разносторонние характеристики состояния организма амфибий, обобщенные в один безразмерный показатель и представленные в виде гистограммы, визуализируют различия в состоянии живых организмов, обитающих в качественно отличающихся условиях среды (рисунок).

Количественно-качественный принцип развития адаптационных реакций организма в ответ на действие раздражителей [16–18] позволяет заключить, что в зависимости от интенсивности внешнего воздействия в организме будут развиваться качественно отличающиеся иммунные реакции. В условиях II балла качества среды, соответствующего начальным (незначительным) отклонениям от условной нормы, в организме животных преобладают механизмы повышения неспецифической резистентности организма. Систематическое пребывание животных в условиях среднего и значительного отклонения качества среды от нормы приводит к развитию общих неспецифических реакций, характеризующихся преобладанием процессов анаболизма и специфической стимуляции защитных реакций организма (реакции спокойной и повышенной активации).

Приспособительные реакции организма, среди которых иммунные занимают одно из центральных мест, поддерживают относительное динамическое постоянство внутренней среды. Изменчивость основных иммунологических показателей амфибий отражает наличие адаптаций в популяциях в условиях возрастания прессы антропогенной нагрузки и степень физиологической пластичности вида. Функционирование всех органов и систем за счет перераспределения клеточного баланса основных составляющих иммунной защиты необходимо для сохранения жизни в условиях постоянного воздействия негативных антропогенных факторов. Адаптацией к изменению качества среды является повышение доли агранулоцитов, а также снижение уровня дифференцированных и возрастание уровня низкодифференцированных клеток в периферической крови и лимфоидных органах популяций зеленых лягушек урбанизированной территории. Системность и взаимозависимость иммунных реакций обуславливают сдвиг баланса иммунокомпетентных клеток в целях сохранения целостности иммунной системы организма и поддержания оптимального уровня ее функционирования в процессе адаптации к новым условиям существования и противостояния стрессовым воздействиям среды обитания.

#### Список литературы

1. Захаров В.М. Асимметрия животных (популяционно-феногенетический подход). М.: Наука, 1987. 213 с.

2. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И. и др. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 68 с.
3. Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress // *Heredity*. 1992. V. 68. № 4. P. 361–364.
4. Леонтьева О.А., Семенов Д.В. Земноводные как биоиндикаторы антропогенных изменений среды // *Успехи современной биологии*. 1997. Т. 111. Вып. 6. С. 726–736.
5. Методические рекомендации по выполнению оценки качества среды по состоянию живых существ (оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур). М.: Росмэкология, 2003. 24 с.
6. Ивантер Э.В., Ивантер Т.В., Туманов И.Л. Адаптивные особенности мелких млекопитающих. Л.: Наука, 1985. 320 с.
7. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. 368 с.
8. Исаева Е.И., Вязов О.С. Общая оценка иммунного статуса // *Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье среды*. М.: Биотест, 1996. С. 54–61.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA. М.: Медиа Сфера, 2006. 312 с.
10. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1976. 279 с.
11. Максимов В.Н. Об одном способе оценки качества природных вод // *Самоочищение и биоиндикация загрязненных вод*. М.: Наука, 1980. 212 с.
12. Kaitala S., Maximov V.N. The desirability functions in evaluation of the response of phytoplankton communities to toxicants // *Toxicity Assessment*. 1986. V. 1. № 1. P. 86.
13. Носов В.Н., Булгаков Н.Г., Максимов В.Н. Построение функции желательности при анализе данных экологического мониторинга // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1997. № 1. С. 69–74.
14. Гелашвили Д.Б., Чупрунов Е.В., Иудин Д.И. Структурные и биоиндикационные аспекты флуктуирующей асимметрии билатеральных симметричных организмов // *Журн. общей биологии*. 2004. Т. 65. № 5. С. 433–444.
15. Гелашвили Д.Б., Королев А.А., Басуров В.А. Зонирование территории по степени нагрузки сточными водами с помощью обобщенной функции желательности (на примере Нижегородской области) // *Поволжский экологический журн.* 2006. № 2/3. С. 129–138.
16. Селье Г. Стресс без дистресса. М.: Медицина, 1979. 123 с.
17. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации. М.: ИМЕДИС, 1998. 656 с.
18. Барабой В.А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы. Киев: Фитосоциоцентр, 2006. 424 с.

#### MONITORING OF RANA FROG IMMUNE SYSTEM STATE UNDER ANTHROPOGENIC TRANSFORMATION OF URBAN ENVIRONMENT

*E.B. Romanova*

Immunohematological parameters and development stability have been determined by fluctuating asymmetry (FA) factor of Rana frog population samples inhabiting water bodies in Nizhni Novgorod city and region. An increase in immunological homeostasis disorders has been shown to correlate with the growth of anthropogenic load on the water ecosystem.

*Keywords:* immunohematological parameters, immune system.