

С. Т. НУРТАЗИН, Р. САЛМУРЗАУЛЫ, М. А. СУВОРОВА

БИОИНДИКАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ ОЗЕРНОЙ ИЗ НЕКОТОРЫХ ВОДОЕМОВ ИЛЕ-БАЛХАШСКОГО БАССЕЙНА

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы

Представлены результаты биохимических и гистологических исследований печени озерной лягушки, проведенные с целью биоиндикации состояния некоторых водоемов Иле-Балхашского бассейна, используемых для водопоя скота, полива, купания людей и рыбалки.

Начиная с 70-х годов двадцатого столетия, в Иле-Балхашском регионе резко усилилась тенденция ухудшения экологической ситуации. Все возрастающее потребление воды из рек Семиречья, особенно из р. Иле, включая ее часть, протекающую по территории КНР, загрязнение рек и водоемов сбросами с полей орошения, загрязненными удобрениями, гербицидами, пестицидами и т.п., а также промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми стоками, неконтролируемый туризм, браконьерство и перевылов рыбы, ведут к усиливающемуся истощению водных и биоресурсов, эрозии почв, деградации экосистем.

Все это требует постоянного контроля и оценки состояния экосистем, в первую очередь, водных, как наиболее подверженных загрязнению. Гидрохимические методы достаточно информативны, но эта информация касается лишь конкретного состава воды в момент взятия пробы, тогда как спектр и концентрация растворенных в воде веществ непрерывно изменяется. Поэтому все чаще для диагностики состояния водоемов используют биоиндикационные методы анализа, с помощью которых можно достаточно быстро и дешево определить степень их загрязнения. Преимуществом использования биоиндикационных методов состоит также и в том, что они отражают реакцию организма не только на отдельные загрязнители, но и на весь комплекс воздействующих в течение продолжительного времени загрязнителей.

Для локальных исследований предпочтительней использовать массовые виды животных, популяционные, биохимические и морфофункциональные характеристики которых адекватно отражают уровень загрязнения среды обитания и его влияние на биоту [2]. Этим требованиям отвечает озерная лягушка (*Rana ridibunda* Pall.), широко распространенная в исследуемых водоемах и рекомендуемая для использования в качестве вида-индикатора [3, 4]. Токсические вещества действуют на личинки амфибий, попадая в водоемы при смыте с полей, а на взрослых земноводных при питании отравленными беспозвоночными, как на сушке, так и в воде. Голая кожа амфибий, ее высокая проницаемость, тесный контакт с субстратом способствуют еще более быстрому проникновению в организм животных токсических веществ [12].

Целью нашего исследования являлось биохимическое и гистологическое изучение печени лягушки озерной (*Rana ridibunda* Pall.) в рамках комплексного изучения вида для биоиндикации некоторых водоемов Иле-Балхашского бассейна, широко используемых для полива сельскохозяйственных культур, водопоя скота, рыбалки и купания людей.

Материал и методы исследования

Основные исследования проводились в июне - августе 2010 года в Алматинской области. В качестве биоиндикатора использовалась печень лягушки озерной (*Rana ridibunda* Pall.). Материал для исследования был собран в ходе экспедиционных выездов из следующих точек: сбросного канала с полей орошения Ақделинского массива на р. Иле в районе Баканаса ($44^{\circ}53'20,70''$ С; $76^{\circ}05'06,45''$ В), старицы р. Иле выше моста Д.А.Кунаева, стариц на р. Каскелен, точек на Капшагайском водохранилище ($43^{\circ}53'41,64''$ С; $77^{\circ}12'24,52''$ В), р.Курты ($43^{\circ}52'50,59''$ С; $76^{\circ}19'40,39''$ В) и северной части накопителя сточных вод Сорбулак, а также на прудах севернее пос. Жанаталап

(43°29'20,70" С; 76°05'06,45" В). Для исследования брались половозрелые животные средних размеров.

Для исследования патологических нарушений в печени материал обрабатывался стандартными методами гистологической техники [5]. Интенсивность ПОЛ в тканях печени оценивали по накоплению первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Для биохимического определения продуктов ПОЛ получали супернатант гомогената печени. Для этого кусочки печени, промытой от крови физиологическим раствором, иссекали острыми ножницами, не захватывая соединительную ткань и крупные сосуды, и взвешивали. Брали навеску массой 4 г. Затем с помощью гомогенизатора (Ika-Ultra Turrax, Германия) приготавливали гомогенат из исследуемой ткани на 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4) в отношении 1:5. Все указанные операции проводили при температуре 0–6°C. Затем гомогенат центрифугировали в течение 35 мин. при 6000 об/мин. После чего надосадочную жидкость отбирали для дальнейшего анализа. Содержание малонового диальдегида определяли в супернатанте гомогената печени, используя метод по реакции с тиобарбитуровой кислотой и выражали в нмолях на миллиграмм белка супернатанта гомогената печени [6]. Концентрацию диеновых конъюгатов в супернатанте определяли после их длительной экстракции гептаном [7].

Полученные результаты статистически обрабатывались при помощи стандартного пакета программ Microsoft Office 2003 (приложение Statistica).

Результаты и обсуждение

При исследовании мы учитывали экологические условия обитания животных, в частности, гидрологические особенности водоемов (стоячие водоемы и водотоки), поскольку степень влияния абиотических факторов, как и характер нагрузки на организм, в этих вариантах различаются. Известно, что хладнокровные животные в большей степени, чем гомотермные животные, подвержены влиянию ксенобиотиков, которые, накапливаясь в тканях и органах, в том числе и в печени [8], вызывают в организме различные повреждения [9]. Печень, в силу своих функциональных особенностей, быстрее других органов реагирует на изменение условий внешней среды и действие токсических агентов. Оценивая ряд биохимических показателей функции гепатоцитов, в частности, уровень ПОЛ, можно судить о степени адаптационных или патологических изменений в печени [10]. Усиление ПОЛ в клетках сопровождается нарушением проницаемости мембран, инактивацией мембранных рецепторов и мембранных ферментов, как плазмолеммы, так и мембран органелл. Поскольку интенсификация процессов ПОЛ является неспецифическим, типовым механизмом развития патологических процессов, нами было предпринято исследование содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ в печени лягушек из различных водоемов Иле–Балхашского бассейна. Результаты биохимического анализа представлены на рис. 1 и 2.

Как видно, наибольшее значение продуктов ПОЛ наблюдается в печени лягушек, отловленных в сильно эвтрофированных зарыбленных прудах ниже пос. Жанаталап, где антропогенная нагрузка на водоем очень велика. Высокие значения отмечены также в печени лягушек из накопителя сточных вод г. Алматы Сорбулак. Так, содержание диеновых конъюгатов в печени лягушек из Жанаталапских прудов и накопителя Сорбулака превышает таковое у лягушек из реки Курты в 1,7 ($p<0,05$) и 2,4 раза ($p<0,001$) соответственно. Одновременно у животных, отловленных на Капшагайском водохранилище, по сравнению с остальными исследованными точками, заметно ниже показатели содержания как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ. У животных, отловленных в старицах реки Каскелен, парадоксально высокие значения МДА, что может свидетельствовать об истощении компонентов антиоксидантной защиты в гепатоцитах этих животных.

Непосредственно на реке Иле высокие значения как первичных (ДК), так и вторичных (МДА) продуктов ПОЛ определены у животных, отловленных в отшнуровавшейся старице выше моста им. Кунаева. Определение диеновых конъюгатов имеет значительное преимущество для оценки ПОЛ, поскольку отражает раннюю стадию окисления. Высокое содержание вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида, свидетельствует о снижении активности антиоксидантной защиты в гепатоцитах, и как следствие, повышении вероятности развития в клетках патологических процессов.

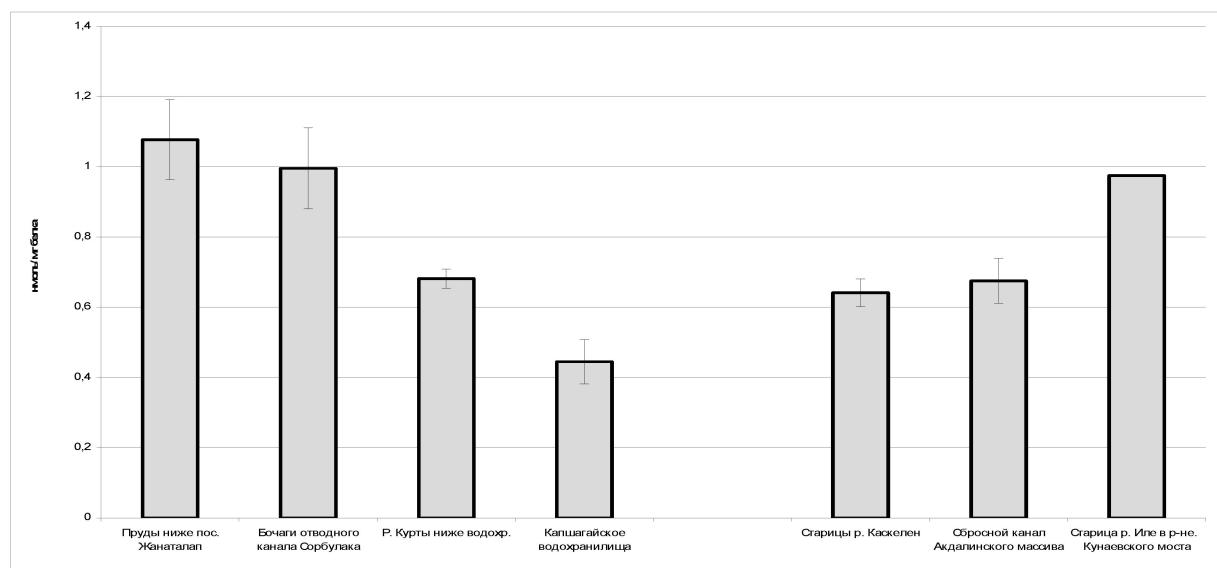


Рис. 1. Содержание диеновых коньюгатов в печени лягушки озерной из некоторых водоемов Иле-Балхашского бассейна ($M \pm m$)

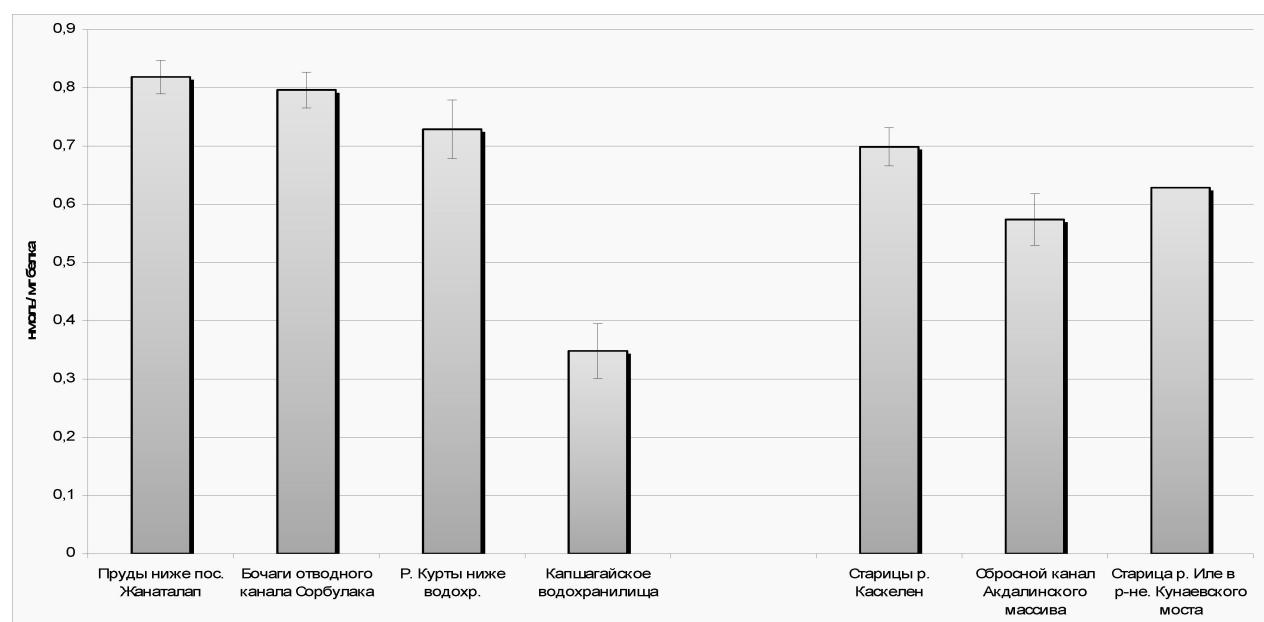


Рис. 2. Содержание малонового диальдегида в печени лягушки озерной из исследуемых водоемов ($M \pm m$)

Как известно, основной причиной гибели гепатоцитов при действии химических веществ является нарушение структурной целостности клеточных мембран в результате интенсификации процессов перекисного окисления липидов в клетках [11]. Наблюдаемое усиление процессов перекисного окисления в печени может быть причиной гибели паренхиматозных клеток печени. Для того чтобы подтвердить предположение о гибели гепатоцитов у исследуемых животных, нами было проведено гистологическое исследование структуры печени лягушки озерной.

В норме в строении печени лягушки озерной выявляется трубчатая структура органа. Гепатоциты представлены крупными клетками с мономорфной цитоплазмой и одним-двумя крупными ядрами. Желчные протоки выстланы кубическим эпителием.

В печени лягушек, обитающих в накопителе сточных вод Сорбулак и на Жанаталапских прудах, наблюдались патологические изменения паренхимы и реакция стромы. В резко расширенных синусоидах видны форменные элементы крови, преимущественно лейкоциты и клеточный дегрит. Цитоплазма клеток имела мономорфное строение и хорошо окрашивалась эозином. Границы клеток не всегда были четко выражены. Темные гиперхромные ядра располагались ближе к васкулярному полюсу. Встречались также мелкие пикнотические ядра и тени ядер. Отмечались нарушения стенок сосудов в виде отслоения эпителиальной выстилки, периваскулярный отек, отек паренхимы и множественные мелкие инфильтраты воспалительного характера.

У лягушек, отловленных в сбросном канале Ақдалинского массива на реке Иле возле поселка Баканас, в печени сохранялось трубчатое строение, трубы ветвились и переплетались между собой. Отмечалось неравномерное расширение синусоидов, в которых встречались элементы крови, в основном эритроциты. Гепатоциты - крупные полиморфные. Ядра также имели полиморфные размеры: крупные, мелкие (пикнотичные), а также полиплоидные. Довольно часто встречались двуядерные формы. Цитоплазма – мономорфная. В синусоидах отмечалась пролиферация клеток Купфера (рис. 3, А). Наблюдался отек паренхимы и имбибиование кровью (рис. 3, Б). Изредка встречались небольшие инфильтраты воспалительного характера, клеточные элементы которых были представлены клетками моноцитоидного типа. Отмечено большое количество мелано-макрофагальных скоплений.

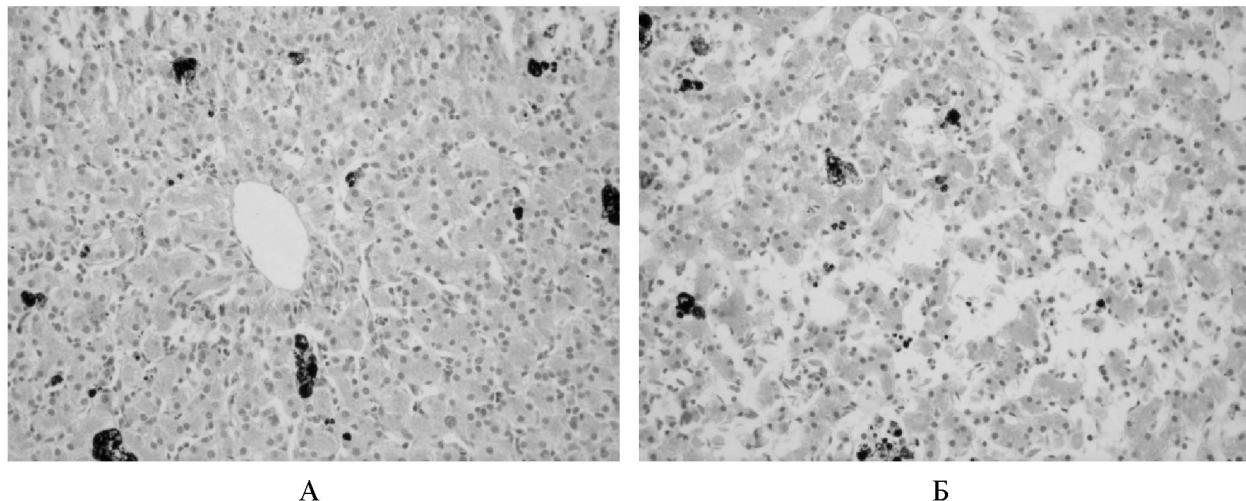


Рис. 3. Печень лягушки озерной из сбросного канала в районе Баканаса. А) Пролиферация клеток Купфера; Б) Отек паренхимы, имбибиование. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. А) х 200; Б) х 400

В печени лягушки, обитающей в районе Кунаевского моста, отмечалось трубчатое строение печени. Неравномерно расширенные синусоиды были заполнены кровью (рис. 4, А). В крупных сосудах также отмечалась стаз крови. Гепатоциты имели гексагональную форму. Ядра – полиморфные: крупные, полиплоидные пикнотичные, обычно были смещены к васкулярному полюсу. Цитоплазма гепатоцитов, как правило, неравномерно окрашена. Более интенсивно окрашенные участки отмечались в районе биллиарного полюса, а более светлые – в районе васкулярного. Отмечались нарушения в виде периваскулярных отеков микроциркуляторного русла (рис. 4, Б).

Встречались крупные и мелкие воспалительные инфильтраты, среди клеточных элементов которых можно было дифференцировать эозинофилы, базофилы, нейтрофилы, гистиоциты. Присутствие эозинофилов косвенно говорит о возможной инвазии животного паразитами. Отмечались множественные очаги некрозов гепатоцитов. Встречалось большое количество мелано-макрофагальных скоплений.

Проведенные исследования печени свидетельствуют о структурно-функциональных изменениях в печени амфибий, отловленных в различных водоемах Иле-Балхашского бассейна. На основании этих данных можно заключить, что животные подвергаются хроническому воздействию негативных факторов среды, в первую очередь, токсичных химических веществ. Причем большая

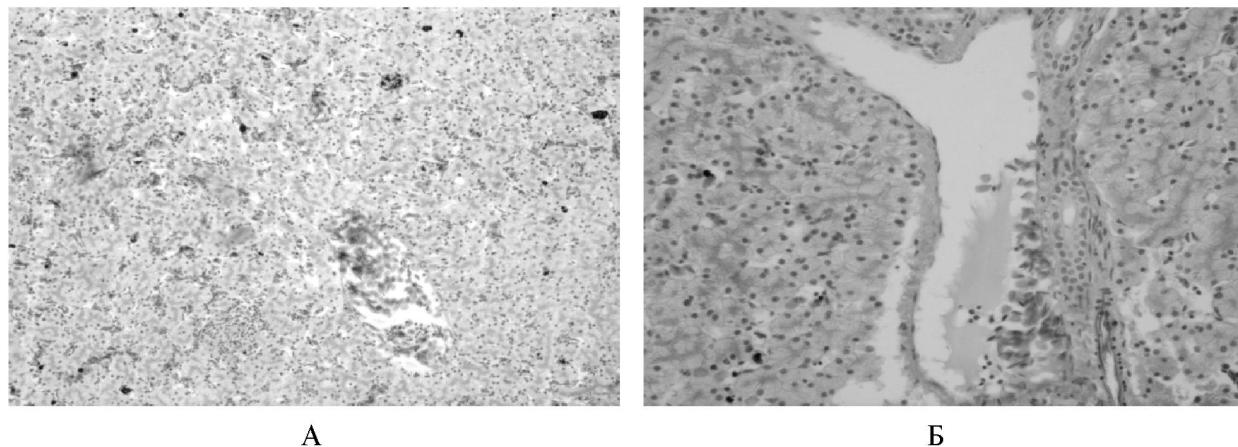


Рис. 4. Печень лягушки озерной, отловленной в старице в районе Кунаевского моста.

- А) Стаз крови крупных и мелких сосудов. Воспалительная инфильтрация.
Б) Периваскулярный отек. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. А) x 100; Б) x 200

токсическая нагрузка на организм индикационных видов рыб и амфибии наблюдается в эвтрофированных водоемах со стоячей водой, где происходит аккумуляция загрязняющих веществ, как то: в Жанаталапских прудах, Сорбулаке и в старице р.Иле в районе Кунаевского моста. Кроме того, снижение функциональной активности печени, помимо физиологических нарушений, делает организм животных более уязвимым к инвазиям и инфекциям различной природы. Сравнительное исследование конечных продуктов перекисного окисления липидов - малонового диальдегида, дисеновых конъюгатов – у амфибий, как биоиндикаторов состояния водных систем, дает адекватную картину уровня суммарного загрязнения среды их обитания. На основании полученных данных можно заключить, что животные из всех исследованных нами водоемов в той или иной степени подвергаются хроническому воздействию негативных факторов среды, в первую очередь, чужеродных химических веществ.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Современное экологическое состояние бассейна озера Балхаш / Под ред. к.г.н. Т. К. Кудекова. – Алматы «Каганат», 2002. – 388 с.
- 2 Пистолова О.А., Трубецкая Е.А. Использование бесхвостых амфибий в биоиндикации природной среды // Биоиндикация наземных экосистем. УрО АН СССР. – Свердловск, 1990. – С. 18-30
- 3 Ковылина Н.В. Использование озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall.) для оперативной индикации техногенного загрязнения водоемов: Дис. ... канд. биол. наук. – Волгоград, 1999. – 150 с.
- 4 Спирина Е.В. Амфибии как биоиндикационная тест-система для экологической оценки водной среды обитания: Автореф. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 23 с.
- 5 Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1953. – 718 с.
- 6 Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 23-25.
- 7 Стальная И.Д., Граишвили Г.Г. Определение МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – Л., 1977. – С. 66-68.
- 8 Lambert M. Use of lizards as bioindicators to monitor pesticide contamination (based on work in Sub-Saharan Africa) // 3 Congresso nazionale della Societa Herpetologica – Italica, Pianura, 2001. – № 13. – Р. 113-118.
- 9 Пескова Т.Ю. Сравнительный анализ реакций трех видов бесхвостых земноводных на загрязнение среды их обитания // Вопросы герпетологии. – М.: МГУ, 2001. – С. 226-229.
- 10 Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. – М.: Гэотар-Мед, 2002. – С. 859.
- 11 Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранных. – М., 1972. – С. 451.
- 12 Леонтьева О.А., Семенов Д.В. Земноводные как биоиндикаторы антропогенных изменений среды // Успехи современной биологии. – 1997. – Т. 117, вып. 6. – С. 726-737.

C. T. Нұртазин, Р. Салмұрзаұлы, М. А. Суворова

ИЛЕ-БАЛҚАШ АЛАБЫНЫҢ КЕЙБІР СУТОҒАНДАРЫНДАҒЫ
КӨЛ БАҚАНЫҢ БАУЫРЫН БИОИНДИКАЦИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУ

Мақалада, егістік және мал суару, сонымен катар балық аулау мақсатында қолданылатын Иле-Балқаш алабында орналасқан кейбір су қоймаларының қазіргі жағдайын анықтау мақсатында, көл бақаның бауырына жүргізілген биохимиялық және гистологиялық зерттеу жұмыстарының нәтижесі көрсетілген.

S. T. Nurtazin, R. Salmurzauli, M. A. Suvorova

BIOINDICATION RESEARCH OF THE LIVER OF THE LAKE FROG
FROM SOME RESERVOIRS OF ILE-BALKHASH BASIN

The result of the biochemical and histological research on marsh frogs' liver is shown in the article. The research was held for bioindication of Ili-Balkhash basin which is used for watering livestock, irrigation, swimming and fishing.