

УДК 57.04, 59.085

СПЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ГОЛОВАСТИКОВ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ И СЕРОЙ ЖАБЫ, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ИМИТАЦИИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СВИНЦОМ И ЖЕЛЕЗОМ

Е.А. Северцова, А.И. Никифорова, Д.Р. Агильон Гуттиеррес

(кафедра биологической эволюции, e-mail: SevertsovaEA@gmail.com)

Визуальный, спектрохимический и гистохимический анализы головастика двух видов бесхвостых амфибий *Rana temporaria* L. и *Bufo bufo* L., развивавшихся в условиях имитации загрязнения воды свинцом и железосодержащими сплавами, продемонстрировали алиментарный путь поступления ионов этих металлов в организм. Накопление ионов этих металлов происходит в тканях кишечника и печени и усиливается по мере развития.

Ключевые слова: головастик, железо, свинец, аккумуляция, гистохимия.

Влияние тяжелых металлов на раннее развитие амфибий в настоящее время изучается довольно широко. Связано это с проблемой разработки методов биоиндикации аккумуляции поллютантов различной природы именно в водных экосистемах. Как отмечают многие авторы, высокие концентрации таких ионов металлов, как алюминий (Al), свинец (Pb), цинк (Zn), кадмий (Cd), ртуть (Hg), серебро (Ag), медь (Cu), мышьяк (As), марганец (Mn), молибден (Mo) и сурьма (Sb), оказывают существенное влияние на ход развития амфибий [1]. К примеру, загрязнение водоема ионами алюминия может приводить к замедлению развития личинок амфибий, а также к возникновению у них аномалий. Кроме того, было показано, что в высоких концентрациях алюминий может быть летален для амфибий [2–5]. В условиях повышенного содержания ионов тяжелых металлов в водоеме у обитающих в нем животных могут возникать физиологические изменения, например повышение уровня метаболизма [6, 7]. Воздействие высоких концентраций металлов способно нарушать работу эндокринной системы и вызвать подавление иммунитета [8]. Показано, что поведенческие реакции также могут меняться под их действием [9].

Свинец во всем мире относится к наиболее распространенным поллютантам. Более чем 4 млн т свинца используется каждый год в аккумуляторных батареях, пигментах красителей, сплавах и боеприпасах [10]. Антропогенная деятельность на протяжении последних 40 лет привела к значительному увеличению распределения свинца, поскольку этот элемент может передаваться через многие трофические цепи и накапливаться в тканях живых организмов, постепенно влияя на кровообращение, работу нервной, выделительной и репродуктивной систем, а также на поведение амфибий [10]. Показано, что свинец оказывает глубокое влияние на развитие скелета головастика

на пред- и постметаморфозных стадиях [11]. Лягушки и головастики, подвергшиеся обработке свинцом в концентрации 1 мг/л в течение 7 дней, менее эффективно избегают нападения хищников [12].

В отличие от свинца железо — важнейший компонент нормального метаболизма позвоночных животных, в том числе и амфибий. Концентрации его в организме невелики и составляют примерно 0,01% от массы тела животного. Железо незаменимо в процессах кроветворения и внутриклеточного обмена. Примерно 55% железа входит в состав гемоглобина эритроцитов, около 24% участвует в формировании миоглобина и примерно 21% депонируется в печени и селезенке [13]. Тем не менее высокие концентрации железа могут вызывать угнетение активности пищеварительных ферментов, нарушать проницаемость клеточных мембран [14]. На развитие амфибий высокие концентрации железа также оказывают негативное воздействие, хотя для разных стадий разных видов уровень концентрации железа может быть различным. Так, при концентрации ионов железа в воде от 20 до 30 мг/л наблюдается 100% смертность головастика *Bufo boreas* [15]. В меньших концентрациях железо может приводить к замедлению развития, что, например, показано для зародышей шпорцевой лягушки [16].

Таким образом, два металла, свинец и железо, представляют собой достаточно обычные поллютанты урбанизированных территорий. Они, несомненно, способны оказывать влияние на ход нормального развития амфибий. Большинство исследований посвящено изучению влияния растворимых соединений данных металлов на амфибий. Тем не менее загрязнение водоемов, как правило, характеризуется не столько загрязнением растворимых солей, сколько наличием в водоемах металлических конструкций. Личиночные стадии развития амфибий являются эврифагами, питающимися соскребыванием бактериаль-

ного нароста с поверхности подводных частей растений, донных осадков и т.д. Особенности их поведения не исключают возможности соскребывания головастиками поверхности металлсодержащих конструкций. Целью нашей работы было исследование характера проникновения ионов металлов с поверхности железо- и свинецсодержащих конструкций в организм головастиков.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны два наиболее типичных для средней полосы России представителя бесхвостых амфибий — лягушка травяная (*Rana temporaria* L.) и жаба серая (*Bufo bufo* L.). Эксперименты проводили на Звенигородской биологической станции МГУ с мая по июль 2011 г. на головастиках, выращенных из икры, собранной в местных водоемах. Всего было задействовано 12 кладок амфибий каждого вида. Кладки икры разделяли на три визуально равные части и помещали в индивидуальные аквариумы с объемом воды 20 л с водой из нативного водоема. В аквариумы к животным первой экспериментальной группы были добавлены строительные гвозди (56 граммов на литр воды), в аквариумы второй экспериментальной группы — шарики свинцовой охотничьей дроби (30 граммов на литр воды), оставшаяся третья группа животных служила в качестве контрольной. Головастиков содержали в условиях естественного светового дня, кормили измельченными листьями крапивы. Стадии развития головастиков определяли по таблицам нормального развития для *R. temporaria* [17] и таблицам нормального развития для *B. bufo* [18].

В ходе эксперимента головастиков разных стадий фиксировали в 10%-м формалине. Часть зафиксированного материала была использована для гистологических (патоморфологических) исследований органов головастиков, часть — для спектрохимического анализа тканей животных. В патоморфологическое исследование были включены: кожа с области “щеки”, сердце, печень, жабры, поджелудочная железа, кишечник и вторичные почки головастиков. Органы извлекали из фиксированных головастиков, подвергали стандартной гистологической обработке, заливали HISTOMIX EXTRA (“BioVitrum”) и получали срезы толщиной 4–5 мкм. Дополнительно были получены препараты серийных срезов тела животных в трансверсальной плоскости. С целью выявления трехвалентного железа в тканевых образцах препараты окрашивали по методу Перлса [19]. Для выявления свинца на срезах проводили качественную реакцию с использованием родизоната натрия (“Диаэм”) [20]. Препараты анализировали под микроскопом Axio Scope A1 (“Carl Zeiss”), микрофотографирование осуществляли камерой MRc.5 (“Carl Zeiss”).

Для определения концентрации накопленных ионов железа и свинца в Институте проблем техно-

логии микроэлектроники и особо чистых материалов Российской академии наук (ИПТМ) РАН (г. Черноголовка, Московская обл.) был проведен спектрохимический анализ тканей головастиков. На 39-й стадии развития у головастиков травяной лягушки и на 26-й стадии развития у серой жабы удаляли кишечник и анализировали отдельно ткани тела головастика и ткани с содержимым кишечника. На 43-й стадии развития травяной лягушки и на 34-й стадии развития серой жабы помимо отдельного анализа тканей тела и тканей кишечника в ряде случаев был проведен анализ тканей хвостовой пластины, печени и жабр. Формирование проб для проведения спектрохимического анализа методически не позволяло проанализировать каждого головастика в отдельности. В каждую пробу отбиралось по 7–12 головастиков из одной повторности для каждой серии эксперимента.

Химический анализ воды из исследованных водоемов был выполнен лабораторией источников водоснабжения Института “Водоканал”, НИИ “Проект” № Росс.RU001.510516. Состав воды оценивали по следующим показателям: мутность (мг/л), pH, общая жесткость (мг · экв/л); также была определена концентрация ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (мг · экв/л), Cl^- , SO_4^{2-} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} и Fe^{3+} (мг/л), HCO_3^- (мг · экв/л) и нефтепродуктов (мг/л).

Результаты и обсуждение

Проведение эксперимента по имитации загрязнения водоема железосодержащими и содержащими свинец сплавами показало, что наличие металлургических соединений в воде не ведет к существенным изменениям химического состава воды. В воде из нативного водоема содержание ионов железа составляло 320 мкг/л, а свинца — в концентрации 0,2 мкг/л в воде. В этих условиях проходило развитие контрольной группы. В аквариумах, куда соответственно добавляли ржавые гвозди для имитации загрязнения железом и свинцовую дробь для имитации загрязнения свинцом, концентрация этих элементов составляла 340 мкг/л железа и 0,3 мкг/л свинца. Такое незначительное увеличение концентраций, измеренное по окончании эксперимента, позволяет судить о фактическом отсутствии растворения этих элементов, которое наблюдалось бы при более кислом значении pH. Вода же, используемая для экспериментальной работы, имела нейтральные значения pH (в зависимости от аквариума от 6,9 до 7,2). Таким образом, добавление железо- и свинецсодержащих сплавов в экспериментальные аквариумы не привело к изменению общих условий развития по сравнению с контрольной группой. Однако условия эксперимента увеличили доступность поллютантов для головастиков, об этом позволяет судить визуальное сравнение кишечника животных в контрольных и экспериментальных группах (рис. 1). Вскрытие головастиков, развитие которых проходи-

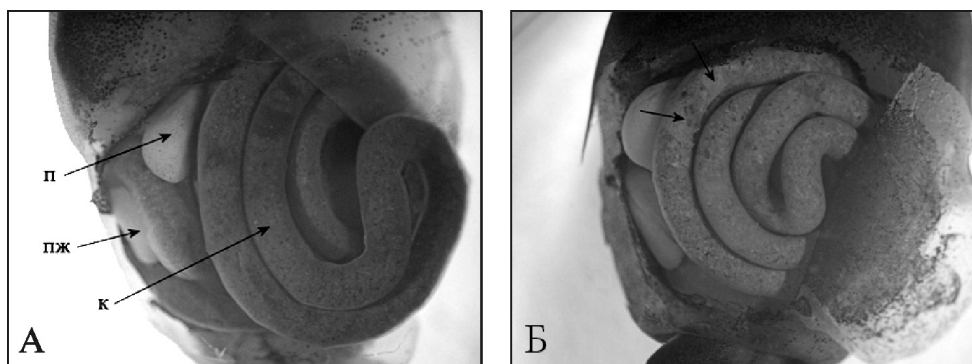


Рис. 1. Макроморфология внутренних органов головастика *B. bufo* на 34-й стадии развития, вид с вентральной стороны: А — головастик контрольной группы; Б — головастик, развивавшийся в условиях имитации загрязнения водоема железом; стрелками отмечены участки кишечника, содержащие крупные включения цвета ржавчины; к — кишечник, п — печень, пж — поджелудочная железа

ло в воде с железосодержащими сплавами, обнаружило наличие в содержимом кишечника включений с характерным цветом ржавчины (рис. 1, Б). У головастика, развивавшегося в воде с шариками свинцовой дробы, кишечник был наполнен серебристой массой.

Спектрохимический анализ тканей выявил тенденцию к аккумуляции железа и свинца в тканях головастика, развитие которых проходило в экспериментальных аквариумах (рис. 2). Пятикратные различия в уровне содержания ионов железа в тканях тела головастика наблюдаются на 39-й стадии развития *R. temporaria* контроля и эксперимента и семикратные — на 43-й стадии. У *B. bufo* аналогичные различия выражены еще сильнее: показана 19-кратная разница между содержанием железа в эксперименте и контроле для 34-й стадии развития.

В то же время анализ других тканей головастика выявил неравномерное накопление анализируемых элементов в разных системах организма. Наиболее высокие показатели содержания железа и свинца характерны для кишечника головастика. Концентрация свинца в кишечнике может превышать таковую в теле головастика в 9,4 раза на 34-й стадии развития серой жабы и в 13,15 раза на 43-й стадии развития головастика травяной лягушки. Различия в концентрации ионов железа в кишечнике и в тканях тела не менее существенны: у *B. bufo* в 8,1 раза, а у *R. temporaria* в 11,42 раза. Интенсивность аккумуляции исследуемых элементов в печени головастика *R. temporaria* не менее существенна. Концентрация железа в печени травяной лягушки была в 5,86 раза выше, чем в тканях тела, но в 1,94 раза меньше, чем в кишечнике. Содержание свинца в печени травяной лягушки в 2,31 раза выше, чем в тканях тела, но в 5,68 раза меньше, чем в кишечнике. У жабы концентрация железа в тканях печени не измерялась. Результаты анализа концентрации свинца для *B. bufo* показали, что в 1,84 раза его больше в печени, чем в тканях тела, но в 5,13 раз меньше, чем в кишечнике.

Сравнение 39-й и 43-й стадий развития травяной лягушки и 26-й и 34-й стадий соответственно для серой жабы продемонстрировало накопление исследуемых металлов по мере онтогенеза. Это свидетельствует об отсутствии или несовершенстве механизмов выведения их из организма. Другой возможной причиной может быть недостаточно репрезентативная выборка для спектрохимического анализа, отразившаяся на данных анализа по железу для травяной лягушки. У *R. temporaria* кон-

центрация железа в “теле” и в “кишечнике” снизилась на более поздней стадии развития.

Приведенные результаты свидетельствуют о преимущественно пероральном поступлении металлов в организм головастика. Это подтверждают и исследования [21], показавшие высокие концентрации некоторых металлов в разных отделах пищеварительного тракта озерной лягушки и зеленой жабы. Однако незначительное количество металлов в тканях жабр свидетельствует о том, что это далеко не единственный путь поступления ионов металлов в организм личинок бесхвостых амфибий. Некоторое их количество может попадать вместе с водой, которую головастики постоянно фильтруют, отцеживая пищевые частички и пропуская воду через жабры. Тем не менее концентрация металлов в тканях жабр настолько невелика (рис. 2), что рассматривать этот путь проникновения ионов в организм нецелесообразно. Головастики являются эврифагами. В естественных условиях они часто питаются детритом и донными отложениями [22], а основное депо металлов в водоемах — донные осадки. При экстраполяции результатов данного эксперимента на природные условия надо учитывать, что распространение металлов, депонированных в теле головастика, по пищевой цепи ограничено. Основные хищники, уничтожающие головастика, — это личинки *Ditistidae* и *Aeshnidae*, которые метаморфизуют и, следовательно, выносят какую-то часть металлов из водоемов. Выносят свою часть и метаморфизовавшие головастики. Однако едва ли этот вынос играет заметную роль в круговороте веществ. Можно считать, что головастики — не окончательное депо металлических поллютантов в антропогенных биоценозах.

Гистохимический анализ органов и тканей животных контрольной и экспериментальных групп был направлен на выявление путей распространения металлов, а также на определение мест их депонирования в организме головастика. Согласно исследованию, положительную реакцию на наличие соединений железа демонстрируют препараты печени и кишечника головастика обоих исследованных видов

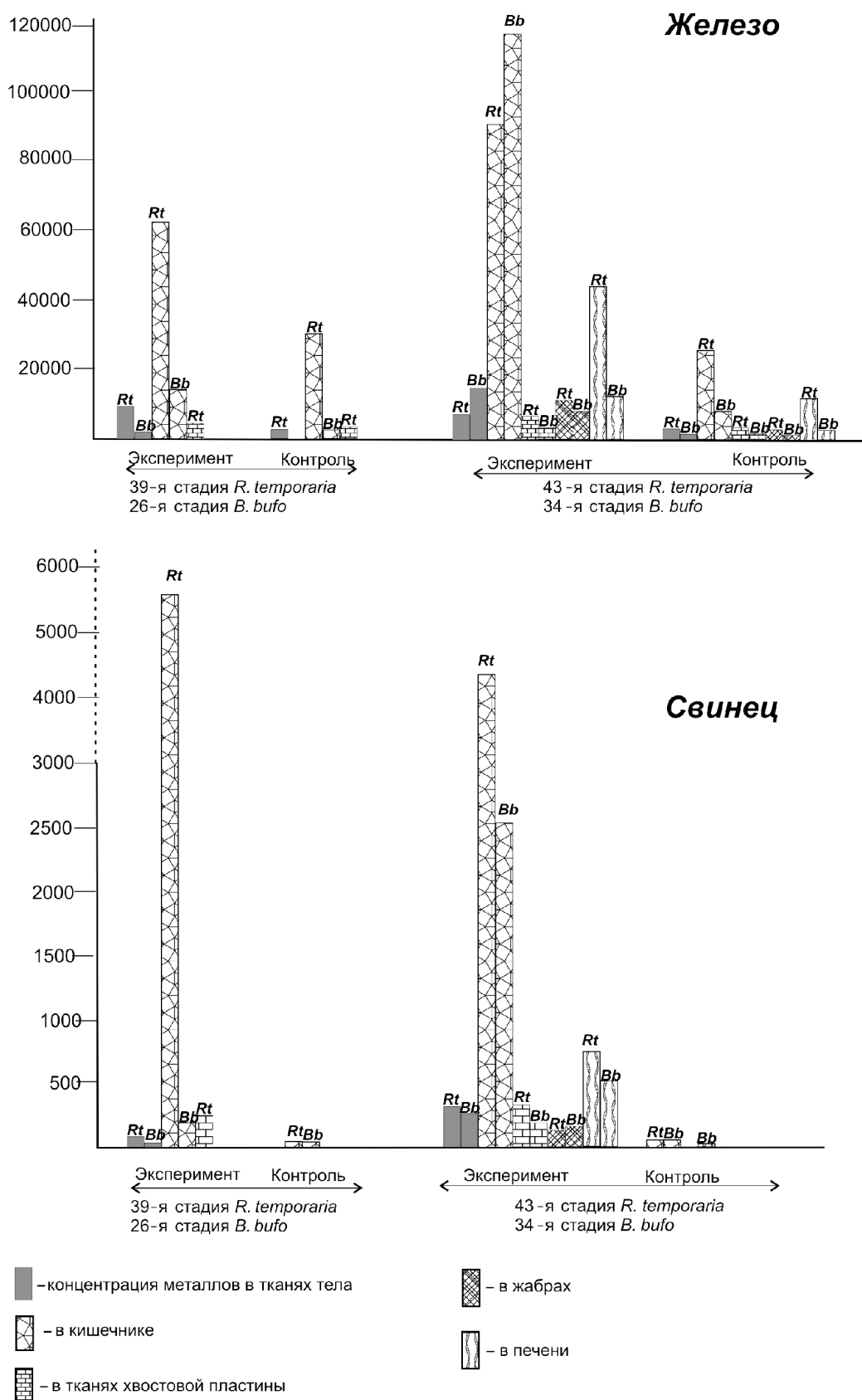


Рис. 2. Результаты спектрохимического анализа тканей головастиков *R. temporaria* и *B. bufo*

амфибий (рис. 3, 4). Полученный результат подтверждает результаты спектрохимического анализа тканей головастиков и выглядит биологически значимым, по-

скольку печень функционально связана с метаболизмом железа в организме животного и является органом естественного депонирования железа. Депозиты

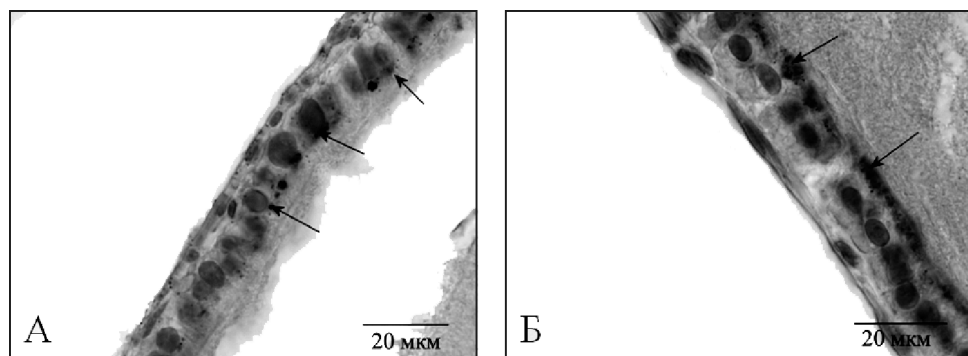


Рис. 3. Гистохимическое выявление железа в стенке кишечника *B. Bufo*: А — участок тонкого кишечника головастика контрольной группы на 34-й стадии развития; Б — участок тонкого кишечника головастика, развивавшегося в условиях имитации загрязнения водоема железом, 34-я стадия развития. Стрелками отмечены области выявления железа

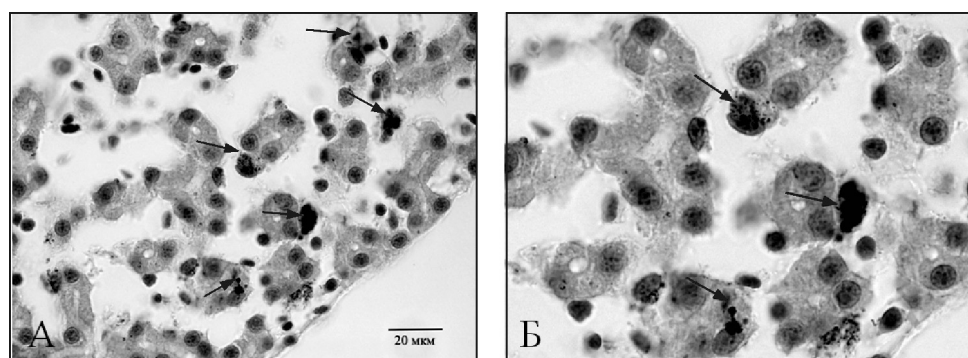


Рис. 4. Гистохимическое выявление железа в печени головастика *R. temporaria*, развивавшегося в условиях имитации загрязнения водоема железом. А — печень головастика на 43-й стадии развития; Б — увеличенный фрагмент А. Стрелками отмечены пигментсодержащие клетки печени, депонирующие железо

железа в печени головастика как контрольной, так и экспериментальных групп выявляются в ассоциации с клетками, содержащими черно-бурый пигмент (рис. 3). Наиболее вероятными кандидатами на роль клеток, аккумулирующих соединения железа, являются меланинсодержащие макрофаги, или купферовы клетки печени [23, 24]. В печени они функционируют как макрофаги, а также способны к аккумуляции железа в составе гемосидерина и ферритина. В отличие от пигментсодержащих клеток гепатоциты, имеющие каноническую морфологию, включения железа, выявляемые гистохимически, в цитоплазме не содержат. Окрашивание на железо характерно для отдельных участков тонкого кишечника как экспериментальной, так и контрольной групп головастика. Однако более интенсивный характер окрашивания

стенки кишечника у опытных животных указывает на повышенное поглощение железа в условиях эксперимента (рис. 4). Такие участки включения железа в стенке кишечника могут быть продолжительны, в некоторых случаях можно обнаружить непрерывные линии, что свидетельствует об интенсивном поглощении экзогенного железа из содержимого кишечника головастика экспериментальной группы. Положительная реакция на наличие соединений железа ассоциирована с апикальной, обращенной к просвету кишечника поверхностью энтероцитов (рис. 4).

Во вторичных почках накопление соединений железа выявлено не было. Это нетривиальный результат, поскольку почки связаны с выведением железа из организма и факт обнаружения его в секрете мог бы указывать на избыток железа.

Признаков аккумуляции свинца в различных органах головастика *R. temporaria* и *B. bufo*, детектируемых гистохимическими методами, обнаружено не было. Возможно,

дальнейшие исследования и более тонкий подбор методик позволят идентифицировать выявленный спектрхимическими методами факт аккумуляции ионов свинца в тканях.

Таким образом, гистохимический анализ тканей головастика на содержание в них ионов железа подтвердил результаты, полученные на основе спектрхимического анализа: основной путь поступления железа в организм головастика ионов металлов алиментарный. У личинок бесхвостых амфибий нет эффективного механизма выведения металлов, но существует механизм, смягчающий токсическое действие переизбытка железа. В качестве такого механизма могут выступать процесс поглощения ионов металлов макрофагами и депонирование в печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. State of the environment advisory council, 1996. An independent report presented to the commonwealth minister for the environment by the state of the environment advisory council. 46 p.
2. Clark K.L., La Zerte B. A laboratory study on the effects of aluminium and pH on amphibians eggs and tadpo-

les // Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences. 1985. Vol. 42. P. 1544—1551.

3. Freda J., Cavdek V., McDonald D. Role of organic complexation in the toxicity of aluminum to *Rana pipiens* embryos and *Bufo americanus* tadpoles // Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences. 1990. Vol. 47. P. 217—224.

4. Blaustein A.R., Romansic J.M., Kiesecker J.M., Hatch A.C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian populations declines // *Diversity and Distributions*. 2003. Vol. 9. P. 123—140.
5. Crawshaw G. Anurans (Anura, Salientia): Frogs, Toads // *Zoo and wild animal medicine* / Eds. M.E. Fowler, R.E. Miller. Saunders, 2003.
6. Rowe C.L., Kinney O.M., Nagle R.D., Congdon J.D. Elevated maintenance costs in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to a mixture of trace elements during the embryonic and early larval periods // *Physiol. Zool.* 1998. Vol. 71. P. 27—35.
7. Rowe C.L., Hopkins W.A., Coffman V.R. Failed recruitment of southern toads (*Bufo terrestris*) in a trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effects that may lead to a local population sink // *Arch. Environment. Contam. Toxicol.* 2001. Vol. 40. P. 399—405.
8. Blaustein A.R., Kiesecker J.M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations // *Ecol. Letters*. 2002. Vol. 5. P. 597—608.
9. Wright K.M., Valls Badia X. Anfíbios // *Atlas de medicina, terapéutica y patología de animales exóticos* / Eds. R. Aguilar, S.M. Hernández-Divers, S.J. Hernández-Divers. Intermedica, 2005.
10. Humphreys D.J. Toxicología veterinaria. Interamericana McGraw-Hill, 1990.
11. Sparling D.W., Krest S., Ortiz-Santaliestra M. Effects of lead-contaminated sediment on *Rana sphenoccephala* Tadpoles // *Arch. Environment. Contam. Toxicol.* 2006. Vol. 51. P. 458—466.
12. Jepson L. Medicina de animals exóticos. Elsevier, 2011.
13. Шапошникова И.А., Болгова И.В. Таблица Менделеева в живых организмах. М.: Бином, 2010.
14. Щербакова Е.Н. Оценка содержания некоторых тяжелых металлов в органах и тканях русского осетра и возможных последствий загрязнения вод Волги на его организм // *Экологические проблемы загрязнения водоемов Волжского бассейна, современные методы и пути их решения*. Волгоград, 2004.
15. Porter K.R., Hakanson D.E. Toxicity of mine drainage to embryonic and larval boreal toads (*Bufo boreas*) // *Copeia*. 1976. Vol. 2. P. 327—331.
16. Dawson D.A., McCormick C.A., Bantle J.A. Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) // *J. Appl. Toxicol.* 1985. Vol. 5. N 4. P. 233—44.
17. Дабагян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // *Объекты биологии развития*. М.: Наука, 1975. С. 442—462.
18. Gosner K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification // *Herpetologica*. 1960. Vol. 16. N 3. P. 183—190.
19. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Л.: Медицина, 1969. С. 424.
20. Кононский А.И. Гистохимия. Київ: Вища школа, 1976. С. 280.
21. Мисиора А.Н., Марченковская А.А. Влияние тепловых электростанций на накопление тяжелых металлов в органах и тканях различных видов земноводных // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, Екологія*. 2002. Vol. 10. N 1. P. 56—60.
22. Северцов А.С. Эволюционный стагиз и микроэволюция. М.: КМК, 2008. 174 с.
23. Bernini F., Gerzeli G. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians // *J. Anat.* 1999. Vol. 195. P. 19—25.
24. Barni S., Bertone V., Frascini A., Bernini F., Fenoglio C. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. // *J. Anat.* 2002. Vol. 200. P. 185—194.

Поступила в редакцию
11.10.12

METAL SOLIDS IN WATER CAUSE METAL ACCUMULATION IN TISSUE THROUGH INGESTION IN TWO AMPHIBIAN SPECIES

E.A. Severtsova, A.I. Nikiforova, D.R. Aguilon Gutierrez

Morphologic, spectrochemical and histochemical examination of *R. temporaria* and *B. bufo* tadpoles grown in water where fragments of steel and lead were introduced reveals ingestion as the entry path of iron and lead ions into the animals' body. Accumulation of lead and iron was detected in tadpoles' gut and liver, increasing in the course of their development.

Key words: tadpole, lead, iron, accumulation, histochemistry.

Сведения об авторах

Северцова Елена Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01; e-mail: SevertsovaEA@gmail.com

Никифорова Елена Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01.

Агильтон Гутierrez Давид Рамиро — аспирант кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01.