

МОРФОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СРЕДНЕГО МОЗГА ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS PALL.*) УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ

Афанаскина Л.Н.¹, Медведева Н.Н.¹, Вершинин В.Л.²

¹ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ», Красноярск, e-mail: afanln@mail.ru;

²Институт экологии растений и животных УрО РАН, лаборатория функциональной экологии наземных животных, Екатеринбург, e-mail: wow@ipae.uran.ru

В статье анализируются морфоцитохимические адаптивные преобразования нейрон-глиальных популяций VI слоя крыши среднего мозга озерной лягушки, обитающей на территориях Красноярского края с повышенным уровнем загрязнения. Средний мозг является высшим интегрирующим центром, обеспечивающим регуляцию и координацию движений земноводных. В условиях антропогенной трансформации среды, на популяционно-клеточном уровне головного мозга амфибий, отмечается ряд компенсаторно-приспособительных реакций. Так, у *Pelophylax ridibundus Pall.* из популяции зоны малоэтажной застройки п. Шарыпово, в нейрон-глиальных популяциях VI слоя крыши среднего мозга наблюдается уменьшение линейных параметров нейронов, увеличение плотности распределения нервных клеток и глиоцитов, уменьшение числа нормохромных клеток, но увеличение количества гиперхромных нейронов, снижение содержания в цитоплазме и ядрах нейронов общих водонерастворимых белков.

Ключевые слова: земноводные, антропогенные биотопы, средний мозг, клеточные популяции.

MORPHOCYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF NEURON-GLIAL POPULATIONS OF THE MIDBRAIN LAKE FROG (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS PALL.*) URBANIZED AREAS OF KRASNOYARSK KRAI

Afanaskina L.N.¹, Medvedeva N.N.¹, Vershinin V.L.²

¹Krasnoyarsk State Medical University n.a. V. F. Voyno-Yasensky of Ministry of health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, e-mail: afanln@mail.ru;

²Institute of Plant and Animal Ecology Russian Academy of Sciences, Laboratory of functional ecology of terrestrial animals, Ekaterinburg, e-mail: wow@ipae.uran.ru

The article analyzes the morphocytochemical adaptive transforms of the neuron-glia populations VI layer of the roof of the midbrain lake frogs that live in areas of the Krasnoyarsk territory with the increased level of pollution. The midbrain is the highest integrating center ensuring regulation and coordination of movements at the lake frogs that live in areas with high levels of pollution. A number of compensatory and adaptive reactions is noted in the conditions of anthropogenous transformation of the environment. So, at *Pelophylax ridibundus Pall.* from population of a zone of low building of the settlement of Sharypovo, of neuron-glia populations of the VI layer *Pelophylax ridibundus Pall.*, living in the area of low buildings settlement Sharypovo: a decrease in linear parameters of the neurons, increasing the density of the distribution of nerve cells and gliocytes, reducing of linear parameters of neurons, but the increasing in the number of hyperchromic neurons, the decreasing in the content in the cytoplasm and nuclei of neurons the total water-insoluble proteins.

Keywords: amphibians, anthropogenic biotopes, midbrain, cellular populations.

Природные популяции земноводных являются чувствительными индикаторами комплексного загрязнения окружающей среды, влияющей на репродуктивную систему, выживаемость, стабильность развития, генетическую структуру, ценоотические связи и коэволюционные взаимоотношения [6]. Исследование функционально-физиологических перестроек в организме амфибий дает возможность получать информацию о механизмах

поддержания устойчивости в условиях урбанизации, адаптивном потенциале популяций и возможности оценить перспективы их жизнедеятельности в конкретных биотопах Красноярского края. **Целью** настоящего исследования явилось изучение специфики морфоцитохимических показателей клеточных популяций VI слоя крыши среднего мозга озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pall.) в зависимости от уровня антропогенной трансформации местообитаний.

Материалы и методы

Исследования проведены на озерных лягушках (*Pelophylax ridibundus* Pall.), отловленных в июне 2008–2009 гг. в популяциях с территории Шарыповского района Красноярского края, который характеризуется значительным уровнем загрязнения [3]. В соответствии с типизацией В.Л. Вершинина [6], комплексно отражающей степень урбанизации, пруд п. Шарыпово относится к зоне малоэтажной застройки, а фоновая территория (где собрана контрольная выборка) выбрана в 23 км от п. Шарыпово, пойма р. Бересь Шарыповского района. Объем материала – 10 особей из зоны малоэтажной застройки (группа 1) и 7 – из загородной популяции (группа 2).

Забор образцов головного мозга животных осуществлялся в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23.08.2010 № 708н г. Москва «Об утверждении правил лабораторной практики». Изъятый мозг фиксировали по стандартной гистологической методике для нервной ткани с последующим изготовлением серийных срезов на санном микротоме «Slide 2002». Готовые срезы, толщиной 5–7 мкм, окрашивали на выявление рибонуклеопротеидных комплексов тионином по Нисслию в модификации И.В. Викторова [2] и на содержание общего белка амидочерным (АЧ 10Б) [4]. Крыша среднего мозга земноводных, *tectum opticum*, состоит из поверхностного, центрального и перивентрикулярного слоев. Последние два слоя (центральный и перивентрикулярный) объединяются в так называемое центральное серое вещество. В перивентрикулярный слой входят 1–6 слои крыши среднего мозга [7]. В данной работе изучены эфферентные нейроны VI наружного зернистого слоя крыши среднего мозга земноводных, идентичные IV слою среднего мозга костных рыб. Средний мозг является высшим интегрирующим центром и обеспечивает регуляцию и координацию движений амфибий. Дифференцировку структур проводили по атласам мозга земноводных [10]. Изучены характеристики клеток – площадь сечения: тела – St, цитоплазмы – Sc, ядра – Sя и структурный ядерно-цитоплазматический коэффициент (сЯЦК), отношение Sя / Sc. Проанализированы плотность распределения нейронов и глиоцитов на единицу фиксированной площади (1 мм²). Подсчитано число нейронов с разной степенью хроматофилии цитоплазмы: нормохромные, гипохромные и гиперхромные [5]. На

препаратах, окрашенных амидочерным 10Б, с помощью микроскопа Zeiss Axioskop со встроенной видеокамерой и прилагаемым программным обеспечением, в нейронах VI слоя крыши среднего мозга количественными методами определено суммарное содержание и концентрация общих водонерастворимых белков, составляющих основу сухого веса клеточных структур [8]. Полученные результаты обработаны непараметрическим критерием Манна – Уитни. Значимыми принимали значения при $p < 0,05$. Статистические данные представлены в виде Me [25; 75].

Результаты исследования

Озерная лягушка на территории Красноярского края является инвазивным видом, появившимся в результате случайного заноса, вероятно, с молодьёю карпа из Европейской части страны [9]. Как полуводный вид *P. ridibundus* заселяет проточные и стоячие водоемы (от мелких луж, речек до крупных рек и водохранилищ). Она предпочитает открытые, хорошо прогреваемые водоемы с густой травяной растительностью [1]. *P. ridibundus* характеризуется высоким окрасочным и пигментным полиморфизмом. Она толерантна к повышенным концентрациям растворенных в воде солей (0,9–8,3 %) и способна обитать в водоемах, загрязненных бытовыми отходами и удобрениями, в окрестностях крупных металлургических и химических предприятий, в условиях, к которым аборигенные виды амфибий не способны адаптироваться [6].

Популяции эфферентных нейронов VI слоя крыши среднего мозга озерной лягушки группы 2 характеризуются наибольшей площадью профильного поля тела клетки в сравнении с лягушками 1 группы. В карихромных клетках данного слоя преобладают значения площади ядра в 1,7 раза у особей группы 1 и 1,5 раза у группы 2 над показателями площади цитоплазмы. Варьирование показателей связано с реактивностью нейронов, обеспечивающих поддержание относительного постоянства внутренней среды организма, необходимой для выполнения конкретных функций, требующих оптимального пластического и энергетического баланса в клетках. В изученных биотопах в нейронах VI слоя площадь профильного поля ядра превышала значения цитоплазмы, поэтому с ЯЦК имел значения больше единицы, но у особей обеих групп значения ядерно-цитоплазматического коэффициента находятся примерно на одном уровне (таблица).

Сравнительные морфоцитохимические характеристики нейрон-глиальных популяций VI слоя крыши среднего мозга озерной лягушки (*P. ridibundus*), Me [25; 75]

Показатель	1 - группа <i>P. ridibundus</i> n = 10, m = 45,1 ± 5,0 г	2 - группа <i>P. ridibundus</i> n = 7, m = 38,4 ± 4,2 г	Значения p
	Параметры нейронов, мкм ²		
Площадь профильного поля тела	14,9 [12,9; 16,5]	21,8 [18,8; 25,3]	p < 0,001

нейрона, St			
Площадь профильного поля ядра, Ся	9,3 [7,6; 10,6]	13,0 [11,3; 15,2]	p < 0,001
Площадь профильного поля цитоплазмы, Сц	5,5 [5,0; 6,0]	8,8 [7,8; 10,1]	p < 0,001
Структурный ядерно-цитоплазматический коэффициент, сЯЦК	1,6 [1,5; 1,8]	1,5 [1,3; 1,7]	p < 0,001
Показатели системы «нейрон-глия» (1 мм ²), абс. число			
Плотность нейронов	6650,1 [5818,9; 8312,6]	6580,8 [5911,2; 7758,5]	p = 0,35
Плотность глиисвоб.	3463,6 [2770,9; 4433,4]	3048,0 [2632,3; 3602,1]	p < 0,001
Плотность глиисат.	2216,7 [1847,3; 2493,8]	2147,4 [1773,4; 2493,8]	p = 0,53
Глио-нейрональный индекс свободная глия, ГНИ своб.	0,5 [0,4; 0,7]	0,5 [0,4; 0,5]	p < 0,001
Глио-нейрональный индекс сателлитная глия, ГНИ сат.	0,3 [0,3; 0,4]	0,3 [0,3; 0,4]	p = 0,89
Оценка хроматофилии нейронов, перерасчет на 100 клеток, абс. число			
Нормохромные нейроны	65,0 [57,1; 72,2]	70,6 [59,4; 76,2]	p = 0,004
Гиперхромные нейроны	23,3 [16,7; 30,0]	17,0 [12,8; 22,2]	p < 0,001
Гипохромные нейроны	12,5 [8,7; 14,3]	12,0 [10,3; 14,0]	p = 0,39
Состояние фонда общих водонерастворимых белков, пкг/мкм ²			
Концентрация белков в цитоплазме, Сц	0,5 [0,5; 0,5]	0,5 [0,4; 0,5]	p < 0,001
Концентрация белков в ядре, Ся	0,2 [0,2; 0,3]	0,3 [0,2; 0,4]	p < 0,001
Регуляторный ЯЦК (Ся/Сц), рЯЦК	0,5 [0,3; 0,6]	0,7 [0,5; 0,8]	p < 0,001
Содержание белков в цитоплазме, Мц	2,8 [2,3; 3,2]	4,0 [3,5; 4,7]	p < 0,001
Содержание белков в ядре, Мя	2,0 [1,5; 2,5]	3,9 [2,9; 5,0]	p < 0,001
Функциональный ЯЦК (Мя/Мц), фЯЦК	0,8 [0,6; 1,0]	1,0 [0,7; 1,2]	p < 0,001

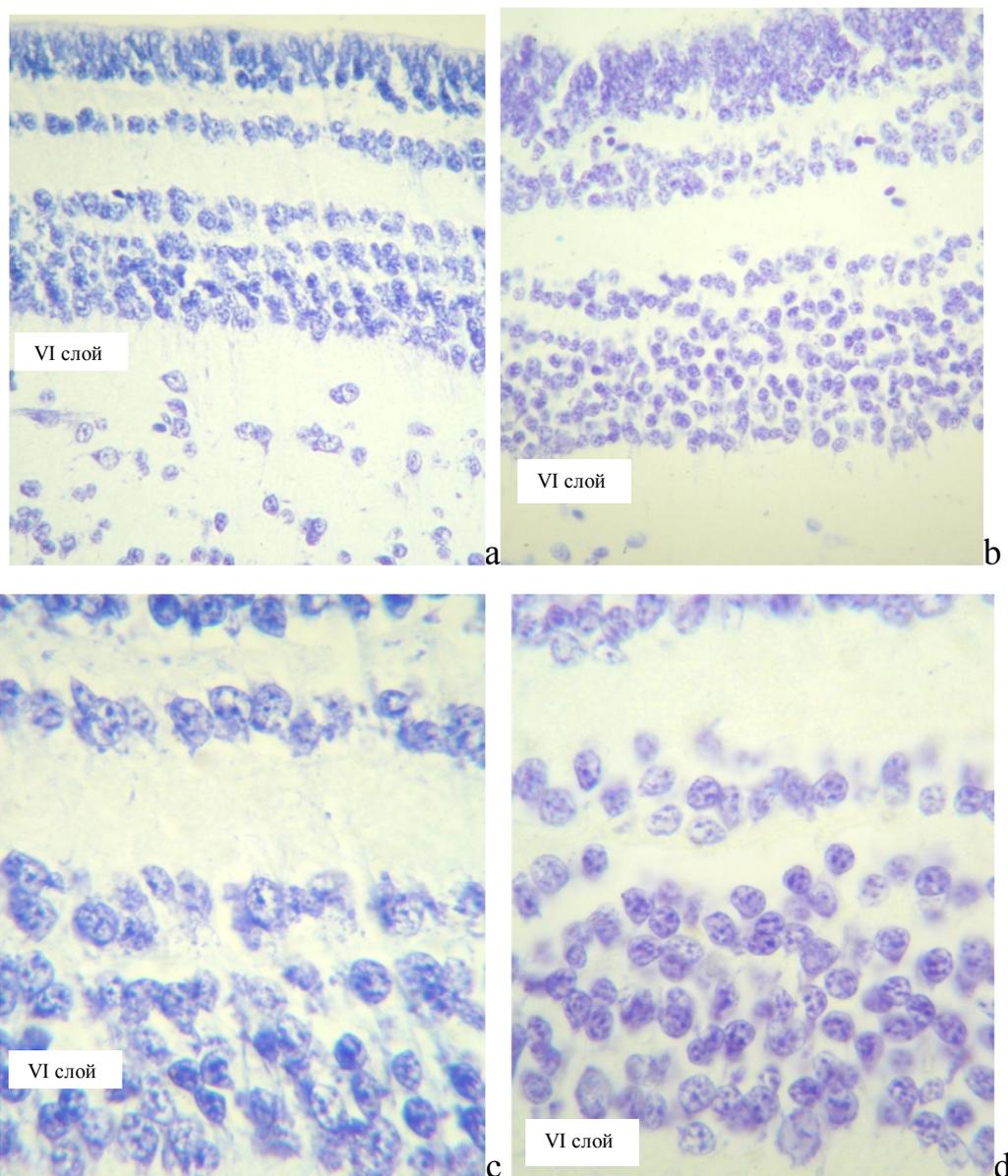
Примечание: достоверность различий по сравнению с показателями особей пруда п. Шарыпово (критерий Манна – Уитни, p < 0,05).

Варьирование показателей профильного поля тел клеток, ядер и цитоплазмы нейронов VI слоя крыши среднего мозга у *P. ridibundus*, следует связать с активным распространением данного вида земноводных по территории южной части Красноярского края, и существованием в среде с комплексом разнообразных по действию экологических факторов, требующих для выживания переадаптации интегративной системы на всех уровнях организации, включая популяционно-клеточный. Выявленную вариабельность линейных параметров клеток можно рассматривать как вариант реактивности нейронов VI слоя крыши среднего мозга *P. ridibundus*, приспособляющегося к водно-наземным условиям существования в биотопах с разным уровнем воздействия антропогенных факторов.

Плотность распределения нейронов в исследуемом слое у озерных лягушек различных биотопов имеет практически идентичные показатели. Значения плотности сателлитных глиоцитов VI слоя крыши среднего мозга у амфибий обеих групп также имеют близкие незначимые различия. Полученные данные плотности свободных глиоцитов выше плотности

сателлитных глиоцитов у *P. ridibundus* обеих групп, что указывает на оптимизацию пролиферативных процессов и миграцию глиоцитов. Увеличение числа свободных глиоцитов у *P. ridibundus* группы 1 свидетельствует о включении компенсаторных механизмов, направленных на стабилизацию функционирования нейронов VI слоя крыши среднего мозга земноводных. Показатели ГНИ своб. преобладают над ГНИ сат. и значимо выше у лягушек 1 группы (таблица).

В популяциях нейронов VI слоя крыши среднего мозга по оценке хроматофильной субстанции у озерных лягушек 1 и 2 групп доминировал нормохромный тип клеток с небольшим содержанием гиперхромных нейроцитов и минимальным количеством гипохромных активно работающих клеток (таблица, рисунок).



Крыша среднего мозга озерной лягушки, I – VI слои. Окраска по Нислю
a, c – *P. ridibundus* пруд п. Шарыпово, b, d – *P. ridibundus* пойма р. Бересь Шарыповский
район, ув. 10x40; c, d – нейроны VI слоя, ув. 10x100

У *P. ridibundus* группы 1 в нейрональной популяции VI слоя наблюдается сдвиг числа нейронов в сторону уменьшения нормохромных клеток и увеличения гиперхромных нейронов, накапливающих тигроид, что свидетельствует о подключении компенсаторных механизмов. Темные гиперхромные нейроны накапливают и не выводят за пределы клеток рибонуклеопротеидные комплексы, что указывает на интенсификацию адаптационных механизмов и создание запасающего фонда в клетках, как приспособление земноводных к обитанию в пруде п. Шарыпово.

В пределах популяций VI слоя крыши среднего мозга у амфибий изученного вида показатели белкового фонда (содержание и концентрация белков) в цитоплазме нейронов выше, чем в ядре. Данные внутриклеточные перестройки обеспечивают нормализацию метаболических процессов и адаптацию к воздействию факторов среды, и также рассматриваются как компенсаторные проявления на уровне клеточных популяций головного мозга.

Оценка состояния белкового фонда нейронов VI слоя крыши среднего мозга показала, что средние значения концентрации белков в цитоплазме клеток (Сц) в изученных биотопах имеют близкие значения показателей и превышают значения концентрации белков в ядре (Ся) в 2,5 и 1,7 раза у *P. ridibundus* 1 и 2 биотопов соответственно. Значения рЯЦК у особей обоих биотопов варьируют в пределах от 0,5 до 0,7, что обусловлено преобладанием концентрации плотных веществ в цитоплазме над таковыми в ядре, при более высоких линейных параметрах последних. При этом значения рЯЦК выше у особей группы 2 в 1,4 раза. Полученные данные также свидетельствуют о снижении интенсивности биосинтеза белка в ядрах клеток и пластического обмена в нейрочитах в целом.

Высокие показатели содержания белков в цитоплазме и ядрах клеток свидетельствуют о повышенной функциональной активности нейронов VI слоя у *P. ridibundus* обеих групп и преобладанием процессов биосинтеза белков над их использованием, что свидетельствует о компенсаторных процессах, направленных на восстановление запаса белков, необходимых для функционирования нейронов и передачи нервных импульсов. У *P. ridibundus* группы 1 содержание белков в цитоплазме нейронов (Мц) в 1,4 раза превышает их содержание в ядре (Мя). У лягушек группы 2 показатели Мц и Мя клеток имеют аналогично высокие и практически идентичные показатели, что свидетельствует о повышении пластического обмена и функциональной активности клеток изученного слоя. Высокие значения фЯЦК (0,8–1,0) у особей обоих биотопов также связаны с превышением содержания белков в цитоплазме нейронов по сравнению с ядром (таблица).

У амфибий группы 1 (с повышенным уровнем загрязнения) концентрация белков в цитоплазме высокая, в ядре низкая, при среднем содержании белков в цитоплазме и низком –

в ядре. Данное сочетание связано с высокой функциональной нагрузкой нейронов у особей, испытывающих воздействие негативных факторов среды.

Заключение

Выполненный анализ морфоцитохимического состояния клеток VI слоя крыши среднего мозга *P. ridibundus*, обитающих на территории с повышенным уровнем загрязнения, выявил ряд однонаправленных компенсаторно-приспособительных изменений: наблюдается уменьшение линейных параметров нейронов, увеличение плотности распределения нервных клеток и глиоцитов, уменьшение числа нормохромных клеток и увеличение гиперхромных нейронов, снижение содержания в цитоплазме и ядрах нейронов общих водонерастворимых белков. Выявленные адаптивные перестройки нейрон-глиальных клеточных популяций более выражены у амфибий (группа 1) из популяции зоны малоэтажной застройки (п. Шарыпово), они направлены на поддержание гомеостаза в организме амфибий, в условиях, сочетающих урбанизацию и загрязнение.

Морфоцитохимические перестройки нейрон-глиальных популяций VI слоя крыши среднего мозга указывают на наличие в среде обитания *P. ridibundus* факторов, ведущих к включению компенсаторных механизмов, находящихся на границе нормы, и нарастанием в изученной клеточной популяции деструктивных процессов. Некоторая пластичность нейроморфологических характеристик нейронов головного мозга позволяет земноводным адаптироваться к антропогенным воздействиям среды, поддерживать жизнеспособность в трансформированных биотопах и распространяться на новые территории Красноярского края.

Список литературы

1. Баранов А.А., Городилова С.Н. Земноводные лесостепи Средней Сибири. – Красноярск: Краснояр. гос. пед. ун-т им. В. П. Астафьева, 2015. – 193 с.
2. Викторов И.В. Окраска нервной ткани забуференным раствором кризилового фиолетового прочного // Современные методы морфологических исследований мозга. – М.: Изд. Ин-та мозга, 1969. – С. 5–7.
3. Государственный доклад «О состоянии и охране окружающей среды в Красноярском крае за 2007 год» / М-во природ. ресурсов и лесн. комплекса адм. Краснояр. края, Енисейс. упр. Федерал. службы по экол.,технол. и атом. надзору, Упр. Федерал. службы по надзору в сфере природопользования по Краснояр. краю. – Красноярск, 2008. – 266 с.
4. Луппа Х. Основы гистохимии. Пер. с нем. – М.: Мир, 1980. – 343 с.

5. Лютикова Т.М., Яценко А.Д. Морфометрические и цитохимические особенности мотонейронов медиальных ядер спинного мозга диких грызунов // Материалы III межрегиональной заочной науч.-практ. конф. Фундаментальные науки – практика. – Ижевск, 2011. – С. 44-47.
6. Неустроева Н.С., Вершинин В.Л. Скелетные отклонения сеголеток бесхвостых амфибий в условиях урбанизации // Вестник ОГУ. – 2011. – № 4. – С.85-90.
7. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л., Анатомия лягушки: практ. пособие для биол., медиц. и с.-х. спец. вузов. – М.: Высшая школа, 1994. – 320 с.
8. Савоненко А.В. Экспериментальное изучение психического влечения к алкоголю у крыс линии Вистар и некоторые цитохимические корреляты этого состояния: дис. ... канд. биол. наук : 03.00.13. – М.: МГУ, 1994. – 155 с.
9. Чупров С.М. Атлас земноводных и пресмыкающихся Красноярского края. – Красноярск: СФУ, 2013. – 52 с.
10. Kemali M., Breitenberg V. Atlas of the frog brain. Berlin: Springer Verl., 1969. – 284 p.