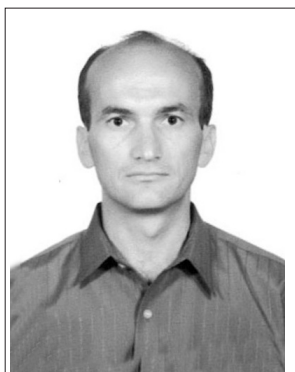


Влияние УФ-излучения на частоту сердечных сокращений личинок амфибий

З.Г. Хабаева, А.К. Бадтиев, Г.М. Чельдиева



К.б.н., доцент СОГУ
З.Г. Хабаева



Зав. лаб. СОГУ
А.К. Бадтиев



К.х.н., доцент СОГУ
Г.М. Чельдиева

Представлены результаты исследований о влиянии УФ-излучения с длинами волн 280–320 нм на частоту сердечных сокращений у амфибий вида *Rana macrocnemis* Boulenger, *Rana ridibunda* Pallas и *Bufo viridis* Laurenti. Установлено, что частоту сердечных сокращений личинок можно использовать как чувствительный показатель при оценке физиологического состояния эмбрионов амфибий.

К числу факторов внешней среды, оказывающих неоднозначное влияние на живые системы, относят ультрафиолетовое (УФ) излучение. Являясь составной частью естественного солнечного спектра, УФ-лучи наряду с другими видами неионизирующего излучения определяют природно-нерадиационный фон. Однако жизнеобеспечивающие пределы варируемости УФ-облучения (УФО), как и любых других видов радиации, имеют ограниченные пределы. Достигнув определенного уровня, они могут проявлять вредное для биоты действие.

Начиная с 70-х годов XX в. в научной литературе активно обсуждается вопрос о повышении интенсивности УФ-излучения в природе в результате загрязнения окружающей среды и уменьшения толщины озонового слоя [9; 8; 14]. В связи с этим резко возрастает роль УФ-излучения, особенно средневолнового диапазона (УФ-В – 280–320 нм), как фактора, дестабилизирующего устойчивость живых систем.

Высказывается предположение о возможном влиянии УФ-В-излучения на снижение численности земноводных и появление у них уродств [4;

5; 6; 7; 10; 11; 12; 13; 15]. Такого рода данные определяют необходимость более тщательного изучения проблемы регулирующей роли УФ-В-излучения в жизнедеятельности биоты в современных экологических условиях.

Цель исследования заключается в изучении особенностей влияния ультрафиолетового излучения средневолнового диапазона, различной интенсивности, на частоту сердечных сокращений у трех видов амфибий.

В качестве объекта исследования использовали зародыши трех видов представителей класса *Amphibia* (земноводные) отряда *Anura* (бесхвостые амфибии) наиболее распространенных на территории Республики Северная Осетия-Алания: лягушки малоазиатской (*Rana macrocnemis* Boulenger), лягушки озерной (*Rana ridibunda* Pallas) и жабы зеленой (*Bufo viridis* Laurenti).

Сбор эмбрионального материала осуществляли в период икрометания в местах наибольшего распространения зародышей амфибий.

Взятие икры производили вместе с водой из водоемов и транспортировали в лабораторию. Здесь икру разделяли на небольшие порции по 30–50 икринок. В кладках малоазиатской и озерной лягушек отбирали икру одной стадии развития и из одной части кладки (верхнего, внутреннего или нижнего слоев). Из кладки жабы зеленой эмбрионы брали из одного участка шнура. В последующем биоматериал помещали в чашки Петри (диаметр 95 мм). В каждую чашку

Количество опытов с физиологическим тестированием (оценка динамики ЧСС) зародышей амфибий

Стадии облучения зародышей	Количество опытов	Количество наблюдаемых эмбрионов в каждом опыте
Зигота	12	10
Дробление	8	10
Бластула	19	10
Гастроула	25	10
Нейрула	19	10

наливали по 20 мл отстоянной более двух суток водопроводной воды комнатной температуры, которая предохраняла эмбрионы от перегрева. Эмбрионы лягушек малоазиатской и озерной в чашках Петри аккуратно расслаивали препаративными иглами на монослой для равномерного облучения. Во всех случаях зародыши располагались таким образом, что их пигментированные анимальные полюса были обращены к облучателю. После облучения эмбрионов для предотвращения их пересыхания в каждую чашку доливали по 20 мл отстоянной воды.

Источником УФ-радиации служил настольный ртутно-кварцевый облучатель ОКН-11М с диапазоном длин волн излучения 280–320 нм. Освещенность действующего фактора на расстоянии 25 см от излучателя составляла $2,1 \times 10^4$ лк. Измерения проводили люксметром «Ю116».

Учитывая центральную роль температурного фактора в определении скорости зародышевого развития, облучение эмбрионов во всех экспериментальных сериях проводили в керамической раковине, используя проточную воду для предотвращения их перегрева. Температура, как в контрольных, так и опытных группах, поддерживалась на одном уровне ($18-20^\circ\text{C}$). Продолжительность облучения была различной в разных экспериментальных сериях и составляла 30–180 с; 200–480 с и 600–900 с. Используя формулу для расчета энергии излучения (освещенность \times на площадь и время облучения), определили дозу облучения, которая при заданных параметрах и продолжительности УФО в 1 с составила $2,1 \text{ Дж/см}^2$.

Таблица 1

Оценку физиологического состояния зародышей амфибий осуществляли на личиночной (30–31) стадии по частоте сердечных сокращений. Как известно, на личиночной стадии у амфибий начинают ветвиться зачатки жабр, видно движение крови в сосудах жаберных отростков, появляются ритмичные сердечные сокращения, которые хорошо определяются визуально [1]. С этой целью в каждом опыте из оставшихся в живых личинок отбирали 10 экземпляров (использован метод случайного отбора). Подсчет ЧСС проводили визуально под микроскопом МБС-1 при окуляре 8х и объективе 2х в 104 экспериментах у 1290 личинок.

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке на персональном компьютере с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03 by Stanton A. Glantz, 1998). Рассчитывали среднюю арифметическую (M), стандартную ошибку среднего (m) и среднее квадратичное отклонение (d). Достоверность различий (P) исследуемых параметров определяли по t -критерию Стьюдента [2].

Исследования проводились с 2002 по 2007 гг. В период с 2002 по 2004 гг. в качестве объекта неионизирующего воздействия были использованы зародыши лягушки малоазиатской и жабы зеленой на разных стадиях развития: зигота; средняя и поздняя бластула; ранняя и поздняя гастроула; нейрула (табл. 2–5). В период работы с 2005 по 2007 гг. оценку состояния зародышевого развития в сходных условиях эксперимента осуществляли у жабы зеленой, лягушки озерной и лягушки малоазиатской (табл. 6–8).

Таблица 2

ЧСС личинок лягушки малоазиатской, подвергнутых УФ-воздействию на разных стадиях зародышевого развития

Стадия облучения	Стат. показатели	Время ультрафиолетового облучения в с				
		Контроль	30	60	90	120
Зигота	n	10	10	10	10	10
	$M \pm m$	$70,6 \pm 3,7$	$62,2 \pm 3,4$	$59,8 \pm 2,7$	$56,2 \pm 1,8$	$56,2 \pm 1,8$
	P		-	<0,05	<0,01	<0,01
Бластула 9-я стадия	n	10	10	10	10	10
	$M \pm m$	$80,8 \pm 1,9$	$69,4 \pm 1,2$	$63,8 \pm 2,2$	$64,8 \pm 1,5$	$62,6 \pm 1,5$
	P		<0,01	<0,05	<0,01	<0,05
Бластула 10-я стадия	n	10	10	10	10	10
	$M \pm m$	$75,6 \pm 0,6$	$78,6 \pm 1,5$	$50 \pm 1,4$	$49,2 \pm 1,4$	$69,2 \pm 2,8$
	P		-	<0,01	<0,001	<0,05

Таблица 3

ЧСС личинок лягушки малоазиатской, подвергнутых УФ-воздействию на разных стадиях зародышевого развития

Стадия облучения	Стат. показатели	Время ультрафиолетового облучения в с				
		Контроль	150	180	300	600
Зигота	n	10	10	10	10	10
	M ± m	70,6 ± 3,7	51,2 ± 1,5	46,4 ± 1,2	45,6 ± 0,8	50,8 ± 1,3
	P		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Бластула 9-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	80,8 ± 1,9	59,6 ± 1,9	70,6 ± 0,8	67 ± 1,5	70,6 ± 1,5
	P		<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
Бластула 10-я стадия	n	10	10	10	10	
	M ± m	75,6 ± 0,6	63 ± 1,9	70,9 ± 5,1	73,4 ± 3,2	
	P		<0,01	-	-	

Таблица 4

ЧСС личинок лягушки малоазиатской, подвергнутых УФ-воздействию на разных стадиях зародышевого развития

Стадия облучения	Стат. показатели	Время ультрафиолетового облучения, с				
		Контроль	30	60	180	300
Гастроула	n	10	10	10	10	10
	M ± m	74,6 ± 1,3	50,2 ± 1,7	53,4 ± 2,3	58,8 ± 2,2	46,8 ± 0,9
	P		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Гастроула 11-я стадия	n	10		10	10	10
	M ± m	74,6 ± 1,6		50,4 ± 1,7	53,4 ± 2,3	58,8 ± 2,2
	P			<0,001	<0,001	<0,001
Гастроула 12-я стадия	n	10		10	10	10
	M ± m	69,9 ± 1,3		49,6 ± 1,9	54,6 ± 2,5	59,9 ± 2,3
	P			<0,05	<0,1	
Гастроула 17-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	82,1 ± 4,7	79,4 ± 1,9	79,4 ± 2,4	80 ± 1,3	82,5 ± 3
	P		<0,01	<0,1	-	-
Гастроула 17-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	82 ± 1,6	66 ± 2,3	70 ± 1,7	69 ± 1,7	77,6 ± 2,2
	P		<0,05	<0,05	<0,001	<0,001
Гастроула 17-я стадия	n	10		10	10	10
	M ± m	74 ± 1,7		67,8 ± 1,2	68,4 ± 1,2	67,4 ± 3,2
	P			-	-	-

Таблица 5

ЧСС личинок жабы зеленой, подвергнутых УФ-воздействию на разных стадиях зародышевого развития

Стадия облучения	Стат. показатели	Время ультрафиолетового облучения, с				
		Контроль	30	60	180	300
Нейрула 20-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	72,6 ± 2,1	79,4 ± 1,9	79,4 ± 6,8	80 ± 1,3	82,5 ± 3
	P		<0,05	-	-	
Нейрула 25-я стадия	n	10	10	10	10	
	M ± m	82 ± 4	92,4 ± 1,1	89 ± 1,9	94,2 ± 1,1	
	P		<0,001	<0,001	<0,001	
Нейрула 28-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	79 ± 0,6	67,6 ± 2,3	70 ± 1,7	69 ± 1,7	77,6 ± 2,2
	P		<0,05	<0,05	<0,05	-

Обобщение результатов, представленных в таблицах 2–5, позволило выделить несколько фактов. В контроле обнаружены сопоставимые показатели частоты сердечных сокращений ли-

чинок: пределы их варибельности составили от 70,6–80,8 уд/мин. Не обнаружены статистически значимые различия в ЧСС в зависимости от вида амфибий (лягушка-жаба). Более того, у

Таблица 6

ЧСС личинок лягушки малоазиатской, подвергнутых УФ воздействию на разных стадиях зародышевого развития

Стадии облучения	Стат. показатели	Длительность ультрафиолетового облучения в с.				
		Контроль	180	240	300	420
Зигота	n	10	10		10	10
	M ± m	88,8 ± 1,5	78,8 ± 2,1		76 ± 2,1	72 ± 1,9
	P		<0,001		<0,001	<0,001
Дробление, 3-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	76,3 ± 2,1	80,3 ± 2,3	79,3 ± 2,5	88 ± 2,6	80,3 ± 3,1
	P		0,217	0,386	<0,005	0,297
Дробление, 4-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	68 ± 1,7	59,2 ± 1,1	58,8 ± 0,8	60 ± 1,4	55,2 ± 1,3
	P		<0,001	<0,001	<0,005	<0,001
Бластула, 10-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	77,6 ± 2,6	64,4 ± 2,4	59,2 ± 3,3	66,2 ± 3,0	67,6 ± 2,63
	P		<0,005	<0,001	<0,01	<0,01
Гастрюла, 17-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	80,4 ± 3,0	62,8 ± 1,6	62,4 ± 2,5	64,8 ± 3,3	70,2 ± 2,7
	P		<0,001	<0,001	<0,005	<0,05
Нейрула, 20-я стадия	n	10	10		10	10
	M ± m	80 ± 2,5	70,8 ± 1,9		70 ± 1,8	68 ± 1,8
	P		<0,01		<0,01	<0,001
Нейрула, 20-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	80 ± 1,7	65,4 ± 2,3	69,8 ± 2,2	63,6 ± 2,0	68,2 ± 2,0
	P		<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
Нейрула, 23-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	68,3 ± 1,7	59,2 ± 2,5	59,3 ± 1,8	58,4 ± 1,2	57,6 ± 0,9
	P		<0,01	<0,005	<0,001	<0,001

Таблица 7

ЧСС личинок лягушки озерной, подвергнутых УФ-воздействию на разных стадиях зародышевого развития

Стадии облучения	Стат. показатели	Длительность ультрафиолетового облучения в с.				
		Контроль	180	240	300	420
Дробление, 7-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	96,8 ± 2,8	76 ± 2,6	78 ± 2,5	86,5 ± 3,0	78 ± 3,6
	P		<0,001	<0,001	<0,05	<0,001
Нейрула, 21-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	100,4 ± 2,8	90 ± 1,9	84 ± 3,8	82,1 ± 2,2	80 ± 5,5
	P		<0,01	<0,005	<0,001	0,005

Таблица 8

ЧСС личинок жабы зеленой, подвергнутых УФ-воздействию на разных стадиях зародышевого развития

Стадии облучения	Стат. показатели	Длительность ультрафиолетового облучения в с.				
		Контроль	180	240	300	420
Бластула, 10-я стадия	n	10	10	10	10	
	M ± m	100,4 ± 2,7	90,6 ± 3,2	92,4 ± 1,5	91,6 ± 1,7	
	P		<0,05	<0,01	<0,01	
Гастрюла, 17-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	92,8 ± 1,4	81,6 ± 1,3	77,2 ± 1,6	91,6 ± 1,8	84 ± 1,8
	P		<0,001	<0,001	<0,613	<0,005
Нейрула, 20-я стадия	n	10	10	10	10	10
	M ± m	97,6 ± 1,1	89,6 ± 2,2	91 ± 2,3	86,4 ± 2,1	86,4 ± 2,9
	P		<0,005	<0,05	<0,001	<0,005

лягушек в контроле обнаружены выраженные различия только в опытах, в которых использовались зародыши на стадии зиготы и ранней бластулы. Однако в опытных сериях направленность изменений ЧСС определялась уже видом амфибий. Так, у малоазиатской лягушки УФ-облучение во всех группах вызвало понижение ЧСС ($p < 0,05 - < 0,001$). Интересно отметить, что такого рода изменения ЧСС наблюдались при использовании даже низких доз воздействия ультрафиолета (от 30 до 180 с.). У зародышей жаб, облученных на стадии нейрулы, 30- и 60-секундное облучение не вызвало каких-либо изменений ЧСС, а 180- и 300-секундное облучение определило повышение данного показателя ($p < 0,05 - < 0,001$).

Проводя исследования с 2004 по 2007 гг., мы увеличили дробность верхней границы дозы облучения – 120, 180, 200, 240, 300, 420, 480 с (табл. 6–8).

Результаты, представленные в таблицах 6–8 отдельно по каждому виду амфибий, свидетельствуют о достоверном понижении ЧСС практически во всех опытах.

Полученные результаты свидетельствуют об информативности данного функционального показателя даже в тех случаях, когда по морфологическим параметрам воздействие УФ-облучения не регистрировалось. Последующие исследования не только подтвердили данный факт, но и позволили выявить особенности динамики ЧСС в зависимости от вида амфибий. Из таблиц 2–4, 6–7 видно, что практически во всех случаях облучение ультрафиолетом, не зависимо от дозы и стадии, на которой было осуществлено воздействие, вызывало у зародышей лягушек понижение ЧСС. Результаты были статистически достоверны. В аналогичных условиях наблюдения соответствующие дозы УФ-облучения у жаб могли вызывать как повышение, так и понижение ЧСС (табл. 5, 8).

Обобщение представленных выше данных позволило выделить ряд общих закономерностей по динамике ЧСС у зародышей амфибий. К их числу следует отнести:

- широкие пределы вариабельности ЧСС в контрольной группе с достоверным уровнем различий среднестатистических показателей как в пределах одной кладки, так и между различными кладками;
- отсутствие линейной связи между дозой УФ-облучения и изменением ЧСС;
- зависимость направленности динамики ЧСС в зависимости от вида амфибий; при этом у лягушек УФО вызывало статистически значи-

мое понижение ЧСС практически во всех опытах независимо от дозы облучения, а у жаб в сходных условиях наблюдения происходило как повышение, так и понижение ЧСС.

В литературе мы не нашли каких-либо данных относительно динамики ЧСС зародышей амфибий в условиях ультрафиолетового воздействия. По этой причине полученные результаты были рассмотрены в рамках существующих представлений об адаптивных изменениях деятельности сердечно-сосудистой системы бесхвостых амфибий при воздействии различного рода раздражителей. В частности, приспособление к гипоксии у них осуществляется путем снижения кислородного запроса. Такой физиологический механизм описан как при адаптации к высокогорью, так и при адаптации к нырянию [3]. Сердечно-сосудистыми приспособлениями служат брадикардия, сужение кожных капилляров, сужение кровеносных сосудов, снабжающих скелетную мускулатуру, уменьшение легочно-кожного кровотока. Брадикардия наряду с другими функциональными изменениями организма выступает в качестве компенсаторного механизма, обеспечивающего переход организма на новый уровень функционирования в измененных условиях среды или поведенческих реакций. Указанные изменения есть результат адаптации организма к уменьшению возможности получения кислорода в течение длительных периодов пребывания под водой или в условиях высокогорья. Исходя из такого рода предположений, мы посчитали возможным рассматривать снижение ЧСС у лягушек на фоне УФ-воздействия как результат включения адаптивных механизмов, обеспечивающих реализацию приспособительных механизмов организма в условиях воздействия раздражителя, выходящего за рамки адекватного, но еще не экстремального. Интересны в этой связи различия в направленности изменений ЧСС, обусловленных УФ, у лягушек и жаб. Как видно из представленных выше данных, зародыши жаб оказались более чувствительны к воздействию УФ по сравнению с лягушками: при одной и той же длительности действующего фактора процент гибели и выраженность дефектов развития была выше у жаб. В таком случае повышение ЧСС у части зародышей жаб, оставшихся в живых после облучения, можно рассматривать как проявление напряженности защитно-компенсаторных механизмов, обусловленных действием экстремального раздражителя.

Литература

1. **Дабагян Н.В., Слепцова Л.А.** Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. – М.: Наука, 1975. С. 442–462.
2. **Плохинский Н.А.** Биометрия // Издательство Московского университета, 1970. 368 с.
3. **Слоним А.Д.** Пойкилотермные организмы в горах // Экологическая физиология животных. Часть III. Физиология животных в различных физико-географических зонах – Л.: Наука, 1982. С. 354–361.
4. **Anzalone C.R., Kats L.B., Gordon M.S.** Effects of solar UV-B radiation on embryonic development in *Hyla cadaveriana*, *Hyla regilla*, and *Taricha torosa*. *Conserv. Biol*, 1998. 12: p. 646–653.
5. **Blaustein A.R.** Chicken little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations // *Herpetologica*, 1994. 50: p 85–97.
6. **Blaustein A.R., Hoffman P.D., Hokit D.G. et al.** UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? // *Proc Nat Acad Sci USA*, 1994. 91: p 1791–1795.
7. **Blaustein, A.R., Belden L.K.** Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation // *Evolution and Development*, 2003. 5: p 89–97.
8. **Hader D.P.** The Effects of Ozone Depletion on Aquatic Ecosystems // Austin, TX: R. G. Landes; 1997.
9. **Kerr J.B., McElroy C.J.** Evidence for large upward trends of ultraviolet-b radiation linked to ozone depletion // *Science*, 1993. 262: p 1032–1034.
10. **Oromi N., Marquis O., Miaud C. et al.** Influence of ambient ultraviolet radiation on *Bufo calamita* egg development in a semiarid zone (Catalonia, Spain) *J. Environ. Biol.*, 2008. 29(1): p 135–137.
11. **Ovaska K., Davis T.M.** UV-B Induced Damage to the Skin and Ocular System of Amphibians // *Biol. Bull.* 2000. 199: p 187–188.
12. **Pahkala M., Laurila A., Merila J.** Carry-over effects of ultraviolet-B radiation on larval fitness in *Rana temporaria*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 2001. B 268: p 1699–1706.
13. **Pounds J.A., Fogden M.P.L., Savage J.M. et al.** Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain // *Conservation Biology*, 1997. 11: p 1307–1322.
14. **Schindler D.W., Curtis P.J., Parker B.R. et al.** Consequences of climate warming and lake acidification for UV-B penetration in North American boreal lakes // *Nature*, 1996. 379: p 705–708.
15. **Stebbins R.C., Cohen N.W.** A Natural History of Amphibians. Princeton: Princeton Univ. Press; 1995.

ОБЪЯВЛЕНИЕ

**Учреждение Российской академии наук
Центр геофизических исследований
Владикавказского научного центра РАН
и Правительства Республики Северная Осетия-Алания**

ОБЪЯВЛЯЕТ ПРИЕМ В АСПИРАНТУРУ НА 2009 ГОД

С ОТРЫВОМ ОТ ПРОИЗВОДСТВА (за счет средств федерального бюджета) по специальностям:
25.00.10 – геофизика, геофизические методы поисков полезных ископаемых – 1 место;
25.00.36 – геоэкология – 1 место.

БЕЗ ОТРЫВА ОТ ПРОИЗВОДСТВА по специальности:
25.00.36 – геоэкология – 1 место.

Заявления и документы принимаются по адресу:
г. Владикавказ, ул. Маркова, 93 а, ЦГИ ВНЦ РАН и РСО-А, отдел аспирантуры
(2-й этаж), тел.: 8 (8672) 76-40-84, тел./факс 76-40-56.