

На правах рукописи



АНДРЕЕВА Елизавета Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ ДЫМА ЛЕСНОГО ПОЖАРА НА СОСТОЯНИЕ
РЕПРОДУКТИВНОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ
У МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Специальность 1.5.15. Экология
(биологические науки)

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Якутск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (г. Ангарск).

Научный руководитель:

Вокина Вера Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований».

Официальные оппоненты:

Голохваст Кирилл Сергеевич, доктор биологических наук, член-корреспондент РАО, профессор РАН, ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологии РАН, директор.

Олесова Любовь Дыгиновна, кандидат биологических наук, ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», лаборатория биохимических и иммунологических исследований отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний».

Защита состоится «27» июня 2022 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.396.01 при ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова» по адресу: 677000 г. Якутск, ул. Белинского, 58; e-mail: dsomet_nefu@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова»: www.s-vfu.ru.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук



М.В. Щелчкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время в мире и во многих регионах России чрезвычайно актуальной является проблема крупномасштабных лесных пожаров, зачастую принимающих характер природного бедствия и наносящих значительный экологический ущерб природным сообществам (Горчаков и др., 2018; Holm et al., 2020; Oliveira et al., 2020). При этом большое значение имеет сохранение биоразнообразия и устойчивости природных комплексов на особо охраняемых территориях, подверженных лесным пожарам. Даже в бореальных лесах Прибайкальского национального парка в последнее десятилетие зафиксировано регулярное возникновение лесных пожаров, при которых максимальная выгоревшая площадь достигает 10 % от всей лесистой территории парка (Государственный доклад..., 2017; Волчатова, 2019; Korytny, Gagarinova, 2020).

В большинстве исследований оценка влияния лесных пожаров на популяции животных проводится на основании динамики их плотности и анализа пространственного распределения животных, среда обитания и пищевые ресурсы которых были изменены на постпожарных ландшафтах (Дыржинов, Гынинова, 2014; Ревуцкая и др., 2018; Белых, Терентьев, 2019; Федорова и др., 2020; Белых, Садовская, 2021). В то же время влияние пожара как экологического фактора, обуславливающего нарушения формирования и восстановления сообществ позвоночных животных, остаётся недостаточно изученным. Основное направление исследований сосредоточено в большей мере на вреде от огня и не включает оценку влияния дыма, выделяющегося от лесных пожаров, тогда как нехватка кислорода и воздействие токсичных соединений в составе дыма могут быть критическими факторами для выживания, адаптации и размножения животных – находящихся как в непосредственной близости к пожару, так и на удалённых территориях, подверженных задымлению. Как известно, дым от лесных пожаров распространяется на большие расстояния и пересекает географические границы, затрагивая области, удалённые от первоначального источника (Dennekamp, Abramson, 2011).

При горении лесной биомассы в атмосферный воздух выделяется многокомпонентная смесь нейро-, репро- и генотоксикантов, включающая ультрадисперсные твердые частицы, озон, оксид углерода, полициклические ароматические углеводороды, диоксиды азота и серы, альдегиды, хлорированные диоксины, свободные радикалы и др. (Liu et al., 2016). В дыме содержание твёрдых частиц PM_{2,5} (диаметром менее 2,5 мкм) гораздо больше, и они медленнее оседают из атмосферы по сравнению с крупными частицами размером менее 10 мкм (PM₁₀).

Известно, что мелкие млекопитающие составляют основу териофауны любой местности и являются важным звеном пищевой цепи. В связи с их высокой плотностью, хорошей изученностью, разнообразием видового состава и быстрыми темпами размножения они являются «маркерами», которые позволяют изучить состояние сообществ и степень воздействия на них дестабилизирующих факторов (Ильяшенко и др., 2015). Однако изучение репродуктивного потенциала животных в условиях лесных пожаров затруднено и не позволяет оценить потенциальную фертильность особей, поскольку необходимы особые условия для отлова и содержания животных, а также системный анализ их репродукции (морфометрия семенника, успешность спаривания, выживаемость выводка), что возможно только в лабораторном эксперименте. Использование экспериментальных моделей в данном случае открывает широкие возможности для изучения механизмов развития патологии при воздействии продуктов сгорания лесной биомассы.

Таким образом, оценка индуцированных дымом эффектов в дикой природе является важной экологической проблемой, которая может иметь критические последствия на индивидуальном и популяционном уровнях. Все вышесказанное определяет необходимость оценки состояния нервной и репродуктивной систем мелких млекопитающих при воздействии дыма лесных пожаров.

Степень разработанности темы исследования. В современной литературе недостаточно представлены исследования по изучению влияния дыма лесных пожаров на здоровье и поведение диких животных. Немногочисленными исследованиями показано, что в период задымления происходит снижение уровня акустической активности экологических сообществ (Lee et al., 2017; Sanderfoot, Gardner, 2021) и изменение индивидуального и социального поведения, а также нарушение энергетического баланса человекообразных обезьян (Cheyne, 2008; Erb et al., 2018).

Известно, что мелкие млекопитающие в условиях пожара пребывают в состоянии резко пониженной жизненной активности, что сопровождается оцепенением животных, обеспечивающим сохранение потребления энергии (Stawski et al., 2015; Matthews et al., 2017; Geiser et al., 2018). В конечном итоге совокупность перечисленных факторов может оказать пагубное влияние на физиологию животных, выражающуюся в нарушении способности к воспроизводству и дестабилизации репродуктивного поведения. Следует отметить, что в литературе не представлены исследования репродуктивного потенциала животных после воздействия дыма лесных пожаров. Непосредственное воздействие дыма на развивающийся организм в ранний антенатальный и пренатальный периоды описано в исследованиях Black с соавторами (2017) и Willson с соавторами (2021), в которых указано, что воздействие повышенных уровней PM_{2.5} при лесных пожарах может иметь негативное влияние на исходы беременности у приматов и приводит к значительному снижению общей ёмкости лёгких их потомства (Black et al., 2017; Willson et al., 2021).

Отсутствие достаточной информации о последствиях пребывания диких животных в условиях задымления при лесных пожарах обусловлено в первую очередь непредсказуемостью возникновения пожаров, что затрудняет наблюдение за животными до и после воздействия, а также сложностью сбора данных в экстремальных условиях. Контролируемые лабораторные эксперименты с использованием модельных видов животных позволяют оценивать прямые эффекты поражающих факторов лесных пожаров при одновременном контроле каждого из них.

Таким образом, вышеизложенное, а также недостаточная информация о последствиях экспозиции дымом лесного пожара на репродуктивный потенциал и поведение мелких млекопитающих свидетельствуют об актуальности данной проблемы.

В связи с этим основной **целью работы** явилось оценить воздействие дыма лесного пожара в условиях экспериментального моделирования на показатели репродуктивной и нервной систем у мелких млекопитающих на примере беспородной белой крысы *Rattus norvegicus*.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Провести оценку качественного и количественного состава продуктов горения биомассы, взятой на территории бореальных лесов Прибайкальского национального парка.
2. Оценить влияние дыма лесного пожара на показатели репродуктивной и нервной систем у подопытных животных сразу после окончания экспозиции и в отдалённом периоде после воздействия.
3. Охарактеризовать поведенческие реакции у потомства подопытных животных, полученного при спаривании сразу после окончания экспозиции дымом лесного пожара и в отдалённом периоде после воздействия.
4. Оценить уровень полногеномного метилирования ДНК в клетках крови, в тканях коры головного мозга и гонадах животных, подвергавшихся воздействию продуктов горения, и его сопряжённость с нарушениями функционального состояния нервной системы у потомства.

Научная новизна. Получены новые научные знания о формировании нарушений репродуктивной и центральной нервной систем у мелких млекопитающих при воздействии дыма, выделяющегося при горении лесной биомассы в условиях экспериментального моделирования, заключающиеся в угнетении сперматогенеза, циклической функции яичников и снижении выживаемости у потомства. Впервые показаны нарушения поведенческих реакций у потомства белых крыс, подвергавшихся воздействию дыма лесного пожара,

характеризующиеся подавлением двигательной и исследовательской активности на фоне повышенного уровня негативного эмоционального состояния и нарушения показателей пространственной памяти. Выявленное повышение уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови экспонированных животных может являться одним из критериев биоиндикации влияния дыма лесного пожара на животных. Установлена связь между эпигенетическими модификациями ДНК клеток крови у родительского поколения, экспонированного дымом лесного пожара, и нарушением нейробиологии поведения их потомства.

Теоретическая и практическая значимость результатов. Внесён теоретический вклад в обоснование экологических последствий воздействия дыма лесного пожара на мелких млекопитающих, согласно которым ответная реакция выражается в снижении репродуктивного потенциала животных, а также в нарушении функционального состояния нервной системы настоящего и последующего поколений. Результаты проведённых исследований расширяют представления об обусловленности показателей тревожности и двигательной активности потомства эпигенетическими модификациями ДНК в клетках крови родительского поколения, индуцированными дымом лесных пожаров.

Практическая значимость работы заключается в перспективном использовании предложенной экспериментальной модели задымления при горении лесной биомассы для обоснования экологического анализа воздействия дыма на биообъекты (заявка на изобретение № 2022107278 от 18.03.2022 «Устройство для моделирования интоксикации у мелких лабораторных животных продуктами горения биомассы»). Результаты проведённых исследований, свидетельствующие о гиперметилировании ДНК в клетках крови экспонированных дымом животных, позволяют рекомендовать данный показатель в качестве критерия биоиндикации при воздействии дыма лесных пожаров.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Репродуктивная функция мелких млекопитающих при воздействии дыма лесного пожара характеризуется угнетением сперматогенеза, изменением циклической функции яичников, снижением выживаемости и нарушением поведения их потомства.

2. Интоксикация дымом лесного пожара вызывает у мелких млекопитающих стойкие нарушения поведения и когнитивных способностей на фоне нейродегенеративных изменений ткани коры головного мозга.

3. Вклад уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови у экспонированного дымом родительского поколения в вариацию показателей поведения их потомства составляет 8–17 %.

Методология и методы исследования. Методология исследования состояла в экспериментальном моделировании воздействия дыма, выделяющегося вследствие лесных пожаров, на белых крысах; их обследовании и спаривании в раннем и отдалённом периодах после окончания воздействия для получения потомства. Основные методы обследования животных включали в себя гистологическое и морфометрическое исследования половых гонад и головного мозга, определение показателей поведения и когнитивных способностей, а также определение уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови, мозга и половых гонадах с последующей статистической обработкой и интерпретацией.

Степень достоверности и апробация материалов исследования. Степень достоверности результатов определяется достаточным числом экспериментальных животных в группах, формированием контрольных групп, адекватными токсикологическими, патоморфологическими и статистическими методами исследования, длительными сроками наблюдения за животными.

Апробация результатов. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: III Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных «Экология и здоровье населения» (Иркутск – Байкальск, 2018); Международной научной конференции «Современные проблемы биологии, экологии и почвоведения» (Иркутск, 2019); III Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных

территорий» (Иркутск, 2020); III Международном Молодёжном форуме «Профессия и здоровье» (Суздаль, 2020); IV Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 2020); Международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда» (Минск, 2020); Annual Multidisciplinary Youth Academic Research Conference «Science Present and Future: Research Landscape in the 21st century» (Иркутск, 2021); Международном конкурсе научных работ молодых учёных медико-биологических специальностей, работающих в Сибири и Монголии (Иркутск, 2021).

Личный вклад автора. Автором проведены сбор и анализ научной литературы по вопросам проблемы лесных пожаров и их воздействия на экологические сообщества диких животных. Сформулированы цель и задачи исследования, определены объекты и объём работы, проведено освоение методов исследований для решения поставленных задач. Осуществлён основной эксперимент по воздействию продуктов горения, выделяющихся при лесных пожарах, на организм мелких млекопитающих. В частности, проведена затравка белых крыс продуктами горения, выполнено обследование родительского поколения и потомства, полученного сразу после воздействия дымом лесных пожаров и в отдалённом периоде, проведены обработка полученных результатов, их обобщение и обсуждение. Также автор самостоятельно произвёл оформление диссертации, подготовил публикации по теме диссертации. Доля участия автора в получении и накоплении результатов составляет 85 %.

Связь работы с научно-исследовательскими темами и программами. Исследования проведены в рамках базовой НИР ФГБНУ ВСИМЭИ «Изучение механизмов метаболических нарушений и их роли в формировании чувствительности к воздействию производственных факторов (НИР 030-1; 2018–2020 гг.), гранта РФФИ «Оценка вклада эпигенетических изменений, обусловленных воздействием продуктов горения (на экспериментальной модели лесного ландшафтного пожара) в развитии отдалённых последствий у последующих поколений» (№ 18-315–00237; 2018–2019 гг.); крупного проекта «Фундаментальные основы, методы и технологии цифрового мониторинга и прогнозирования экологической обстановки Байкальской природной территории» (РАН № 2020-1902-01-071; 2020–2022 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных работ, 2 – в журналах, индексируемых в международной базе Web of Science.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах, состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 17 рисунками. Список литературы включает 153 источника, из которых 110 – иностранные.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С использованием зарубежной и отечественной литературы описаны экологические последствия воздействия лесных пожаров, их негативное влияние на физиологию животных, а также даны физико-географическая характеристика и анализ динамики горимости лесов исследуемой территории Прибайкальского национального парка.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, ОБЪЁМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проводили на базе вивария (ветеринарное удостоверение 238 № 0019994 от 16.10.2019) ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (ВСИМЭИ) с использованием 320 особей беспородных белых половозрелых крыс (60 самцов и 60 самок родительского поколения; 100 самцов и 100 самок потомства) массой 180–200 г. Животные содержались в специальном помещении с 12-часовым светлым/тёмным циклом, регулируемой температурой (22 ± 3 °С) и влажностью 60 %, со свободным доступом к чистой водопроводной воде и пище,

включающей в себя все необходимые витамины и микроэлементы. Все экспериментальные животные получены путём собственного воспроизводства в виварии ФГБНУ ВСИМЭИ.

Работа выполнена с соблюдением правил гуманного отношения к животным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция – октябрь 2008 г.), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986), а также «Правил лабораторной практики» (приказ Минздравсоцразвития № 708н от 23.08.2010). На проведение экспериментов было получено разрешение Локального этического комитета ФГБНУ ВСИМЭИ (протокол № 32/19 от 10.09.2019).

Для достижения цели и решения поставленных задач был выполнен комплекс методов химического анализа, токсикологических, патоморфологических и статистических методов исследований. Для создания токсического эффекта продуктов горения, выделяющихся при лесных пожарах, белых крыс (30 самцов, 30 самок) подвергали ингаляционному воздействию дыма в течение 4 недель в экспозиционных камерах. Крысам контрольной группы (30 самцов, 30 самок) в камеру подавался чистый воздух. Определяли концентрации оксида углерода (CO), твёрдых частиц размером менее 2,5 мкм (PM_{2.5}), метана (CH₄), бензола (C₆H₆), диоксида азота (NO₂), диоксида серы (SO₂), формальдегида, фурфурола, ацетальдегида, Σ предельных углеводородов C₁H₄–C₅H₁₂, Σ предельных алифатических углеводородов C₂–C₁₀. Исследование выполняли совместно со старшим научным сотрудником лаборатории аналитической экотоксикологии и биомониторинга ФГБНУ ВСИМЭИ к.б.н. А.Н. Алексеенко.

Обследование экспонированных дымом животных проводили в два этапа: I этап – сразу после окончания экспозиции, II этап – в отдалённом периоде после воздействия (60 дней). Обследование включало в себя анализ показателей центральной нервной и репродуктивной систем подопытных животных, а также оценку уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови, головного мозга и половых гонад.

Для оценки двигательной, ориентировочной активности, эмоционального состояния животных проводили обследование в тестах «открытое поле»; для оценки пространственной памяти и способности экспериментальных животных к навигационному научению использовали тест «водный лабиринт Морриса». Для детекции эпигенетических изменений в клетках крови, тканях коры головного мозга, семенников и яичников проводили анализ уровня полногеномного метилирования ДНК с использованием метода ДНК-комет с применением рестриктаз HpaII и MspI («СибЭнзим», Россия) (Дурнев и др., 2010; Wentzel, 2010). Далее с целью оценки состояния сперматогенного эпителия, яичников и сенсомоторной коры головного мозга часть животных умерщвляли путём декапитации под лёгким эфирным наркозом для проведения микроскопического исследования сразу после экспозиции и в отдалённом периоде после воздействия. Ритмичность функционирования яичников животных изучалась путём оценки влагиаличных мазков (Руководство по экспериментальному..., 2005). Гистологическое исследование гонад осуществляли по стандартным методикам с окрашиванием парафиновых срезов гематоксилин-эозином. При морфологическом исследовании микропрепаратов яичников подсчитывали количество фолликулов с одним, двумя и более слоями гранулёзных клеток, а также количество атретических тел и граафовых пузырьков. По гистологическим препаратам семенников определяли индекс сперматогенеза, количество канальцев со слущённым эпителием, количество сперматогоний и клеток Лейдига. Исследование выполняли совместно со старшим научным сотрудником лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ ВСИМЭИ к.б.н. М.А. Новиковым и лаборантом-исследователем Е.В. Буйновой. Морфометрический анализ ткани головного мозга включал в себя: обзорную оценку состояния ткани коры головного мозга; подсчёт числа нормальных и дегенеративно изменённых нейронов, глиальных клеток, количества актов нейронофагии. Исследование выполняли совместно со старшим научным сотрудником лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ ВСИМЭИ к.б.н. Е.А. Титовым.

Для получения потомства F1 сразу после экспозиции и через 60 дней проводилось спаривание экспонированных животных с интактными партнёрами в соотношении 1:3 (1 самец

и 3 самки). За два дня до предполагаемой даты родов самок рассаживали в отдельные клетки. Крысята всех групп были отсажены от матерей и разделены по полу на 30-й день жизни. Всего было обследовано 200 особей полученного потомства, которые составили 10 групп животных (по 20 особей в каждой). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

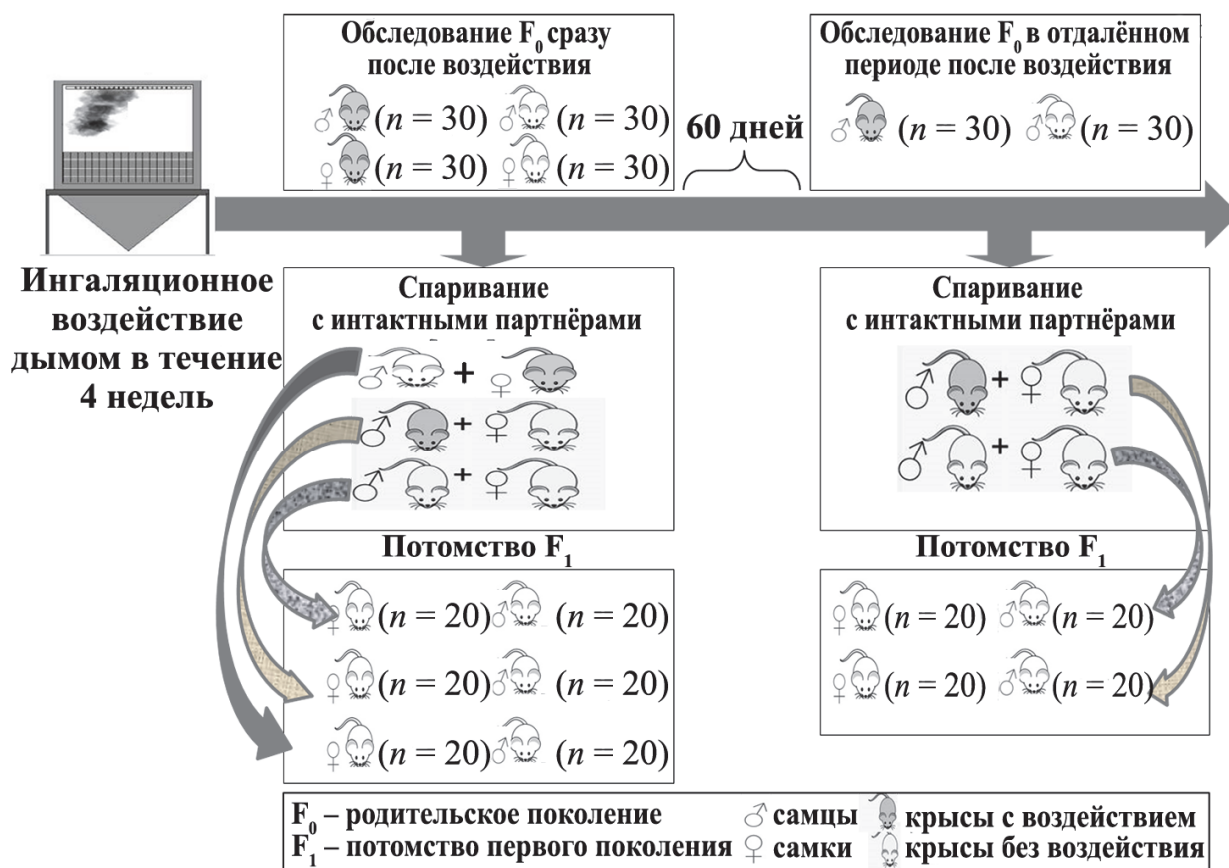


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Установка «открытое поле» представляла собой круглую арену белого цвета диаметром 97 см, с высотой стенок 42 см, диаметром отверстий в полу 2 см. В течение 3 минут регистрировали горизонтальную (ГДА) и вертикальную двигательную активность (ВДА), обнюхивание отверстий, дефекацию, эпизоды груминга и фризинга (замирания). Рассчитывали объём паттернов. Все паттерны систематизировали, после чего выделяли следующие интегральные характеристики индивидуального поведения:

1. Эмоциональная реактивность: сумма неподвижных паттернов «сидит», «фризинг» ($ЭР = Сид + Фр$).
2. Коэффициент ориентировочно-исследовательской активности: сумма активных паттернов – «перемещение», «обнюхивание», «норка» ($К_{оиа} = П + Обн + Н$).
3. Коэффициент подвижности – отношение подвижного паттерна «перемещение» к эмоциональной реактивности ($КП = П / ЭР$).

Водный лабиринт Морриса представлял собой круглый бассейн диаметром 1,5 м, высотой 60 см, наполненный водой температурой около 25 °С до высоты 25 см, замутнённой путём добавления мела. Верхняя поверхность скрытой платформы составляла 14 см в диаметре и находилась на 1,5 см ниже поверхности воды. Проводили четырёхкратное (с интервалом 60 с) тестирование животных последовательно из различных секторов бассейна, при этом местоположение скрытой под водой платформы оставалось постоянным. Время пребывания на платформе составляло 60 с. Регистрировали время поиска платформы.

В половозрелом возрасте (3 мес.) было проведено обследование функционального состояния нервной системы полученного потомства с использованием тестов «открытое

поле» и «водный лабиринт Морриса», а также взят забор материала для гистологических и морфометрических исследований головного мозга.

На завершающем этапе проведены обработка, анализ и обобщение полученных данных, формулировка выводов и рекомендаций. Статистический анализ результатов исследования проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., США; лицензия № AXXR004E642326FA). Для принятия решения о виде распределения признаков использовали W-критерий Шапиро – Уилка. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни, точный двусторонний критерий Фишера, а также были проведены корреляционный, дискриминантный и регрессионный анализы. Нулевые гипотезы об отсутствии различий между группами отвергали при достигнутом уровне значимости соответствующего статистического критерия $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕСНОГО ГОРЮЧЕГО МАТЕРИАЛА ИССЛЕДУЕМОЙ ТЕРРИТОРИИ И ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЛЕСНОГО ПОЖАРА

3.1. Характеристика субстрата

В главе кратко изложена физико-географическая характеристика региона, на территории которого производился сбор образцов субстрата (биомассы). Более подробно даётся описание субстрата, взятого для проведения экспериментального моделирования дыма лесного пожара.

Сбор образцов субстрата проводился на территории Прибайкальского национального парка, на восточном склоне Приморского хребта, в 10 км к северо-востоку от центра сельского поселения – посёлка Бугульдейка, с координатами 52.51° с. ш. и 105.97° в. д. и высотой 922 м над уровнем моря. Выбирали наиболее длительно не горевшие участки леса по спутниковой информации, а также по данным МЧС о возникновении лесных пожаров на данной территории, при этом старались охватить всё многообразие типов лесных ландшафтов данного района. Указывали характеристики рельефа местности, почвенно-грунтовых условий, описывали все компоненты леса, напочвенные лесные горючие материалы (опад, подстилка, мхи, лишайники, верхний горизонт почвы). Субстрат был собран с помощью рамок размером $0,25 \times 0,25$ м и представлял собой биомассу, полностью выгорающую в условиях реального низового пожара. Собранные образцы горючего субстрата хранились в помещении со стандартной температурой и влажностью без прямого доступа солнечного света.

3.2. Характеристика экспериментальной модели лесного пожара

Для выявления токсических последствий воздействия продуктов горения, выделяющихся при лесных пожарах, нами была разработана экспериментальная модель лесного пожара, отражающая естественный процесс горения лесного субстрата, а также проведена оценка химического состава выделяемых газов.

Экспериментальная установка для изучения токсического воздействия продуктов горения, выделяющихся при лесных пожарах, на животных включала в себя камеру, в которой находился нагревательный элемент и субстрат, и соединённую с ней экспозиционную камеру, предназначенную для помещения в неё экспериментальных животных и оснащённую приборами контроля воздушной среды (температура, влажность). Дым, выпущенный из дымогенератора, смешивался с чистым воздухом, нагнетаемым с помощью компрессора, для регулировки концентрации исследуемых газов и твёрдых частиц. Затем дым направлялся в экспозиционную камеру с животными, где с помощью вентилятора поддерживался максимально возможный режим равномерного потока дыма в область дыхания животных. Для отбора проб воздуха в экспозиционной камере на уровне зоны дыхания животных установлен зонд для непрерывного мониторинга концентрации исследуемых газов и твёрдых частиц и достижения необходимого уровня $PM_{2,5}$ и CO. Скорость воздухообмена в камере подобрана с учётом достижения необходимого уровня задымления с одновременным исполнением требований нормы объёма

воздуха на одно животное (5 л/крыса/час). Для обеспечения устойчивости воздушной среды общий объём, занимаемый животными, не превышал 5 % от объёма камеры. Климатические условия в экспозиционной камере во время экспозиции были стабильными, температура составляла 24–25 °С, относительная влажность – 40–60 %.

Главным критерием достижения необходимого уровня загрязнения воздушной среды, близкого к реальным замерам в период задымления от лесных пожаров, являлись показатели содержания в воздухе экспозиционной камеры PM_{2,5} и СО. В таблице 1 представлены результаты замеров в камере проб воздуха при моделировании пожарной эмиссии.

Таблица 1 – Содержание некоторых продуктов горения в воздухе экспозиционной камеры

Вещество	Концентрация, мг/м ³
PM _{2,5}	1,9 ± 0,5
Углерода оксид	27,5 ± 1,2
Смесь предельных углеводородов C ₁ H ₄ –C ₅ H ₁₂	1,28 ± 0,29
Метан	1,42 ± 0,33
Предельные алифатические углеводороды C ₂ –C ₁₀	2,28 ± 0,52
Бензол	0,39 ± 0,10
Азота диоксид	0,032 ± 0,008
Сера диоксид	0,0025
Формальдегид	0,018 ± 0,002
Фурфурол	0,18 ± 0,06
Ацетальдегид	0,65 ± 0,12

В результате проведения качественного анализа общего состава воздуха было установлено, что в камере экспонирования присутствуют в основном соединения следующих классов: гетероциклические альдегиды, терпены, производные терпена, ароматические углеводороды, фенолы. Отмечено значительное выделение следующих соединений: фурфурол, α-пинен, метилфуральдегид, лонгифолин, δ-кадинен.

По результатам целевого качественного анализа летучих альдегидов показано, что в камере экспонирования присутствуют в основном карбонильные соединения следующих типов: альдегиды, линейные C₁–C₆, кетоны, ацетон, дикетоны, диметилглиоксаль и гетероциклические альдегиды, -2-фуральдегид. В наибольшем количестве отмечено выделение следующих соединений: ацетальдегид, формальдегид, пропионовый альдегид и диметилглиоксаль (диацетил).

Таким образом, в ходе выявления токсических последствий воздействия продуктов горения, выделяющихся при лесных пожарах, создана модель устойчивого низового лесного пожара, в процессе которого длительное время горят лесная подстилка, мхи, лишайники, травы, кустарники, опад, ветви, кора деревьев с выделением сильного дыма, при отсутствии пламени. Отмечено, что, несмотря на увеличение количества лесных пожаров, в научной литературе недостаточно информации по оценке выбросов загрязняющих веществ. Так, согласно результатам инструментальных замеров и расчётов концентрации PM_{2,5} в штате Вашингтон и на Аляске, где лесные пожары спровоцировали появление дыма и подвергли диких животных воздействию выбросов загрязняющих веществ, содержание PM_{2,5} достигало уровня 0,5 мг/м³ при допустимых пределах 0,015 мг/м³ (Sanderfoot, Gardner, 2021; Witkop et al., 2021). Концентрации СО в некоторых городах РФ, где лесные пожары спровоцировали появление дыма, в воздухе населённых мест варьировали в диапазоне 3,6–30 мг/м³ (Звягинцев и др., 2011; Панов и др., 2018; WHO Collaborating..., 2010). Целевые исследования газовых примесей в придном слое озера Байкал летом 2018 года во время лесных пожаров в Сибири установили резкое повышение концентрации SO₂ до 0,04 мг/м³ и концентрации NO₂ до 0,03 мг/м³ (Заяханов и др., 2015; Khodzher et al., 2019). В условиях

экспериментального моделирования мы поддерживали уровень загрязняющих частиц в экспозиционных камерах в пределах данных измерений. Таким образом, выбранный нами режим проведения эксперимента позволил воспроизвести уровень задымлённости, близкий к реальным замерам в условиях лесных пожаров.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ БЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ПРОДУКТОВ ГОРЕНИЯ, И ИХ ПОТОМСТВА

4.1. Состояние репродуктивной системы белых крыс сразу после окончания воздействия дымом лесного пожара

Воздействие дыма лесного пожара привело к значительным нарушениям репродуктивной системы белых крыс. Выявлено нарушение циклической функции яичников у опытных самок, выражающееся в неритмичности эстрального цикла и изменении длительности основных фаз. У опытных самок наблюдалось статистически значимое увеличение ($p = 0,021$) длительности фазы диэструса (у 70 % особей), во время которой происходит рост и созревание фолликулов, а также значительное снижение ($p = 0,002$) продолжительности (у 60 % особей) либо отсутствие фазы эструса (у 20 % особей). Для более детального анализа состояния гонад самок проведено морфометрическое исследование яичников экспонированных особей, однако статистически значимых изменений относительно показателей контрольной группы выявлено не было.

При проведении морфометрического исследования особенностей структурной организации семенников белых крыс, подвергавшихся воздействию дыма, выявлено нарушение функционального состояния мужских гонад, о чём свидетельствовало статистически значимое снижение индекса сперматогенеза с одновременным сокращением процентного содержания сперматогониев ($p = 0,03$ и $p = 0,01$ соответственно) по сравнению с контрольной группой. Известно, что сперматогонии являются полипотентными стволовыми клетками сперматогенного эпителия, снижение которых свидетельствует об угнетении процесса сперматогенеза. Кроме того, у животных данной группы выявлено значительное снижение относительного количества клеток Лейдига ($p = 0,0015$; Рисунок 2). Данные клетки являются основным местом синтеза секрета андрогенов, в том числе тестостерона, играющего важную роль в регуляции процессов размножения у самцов и характеризующего мужской репродуктивный потенциал (Mori, Christensen, 1980; Bergh, 1982).

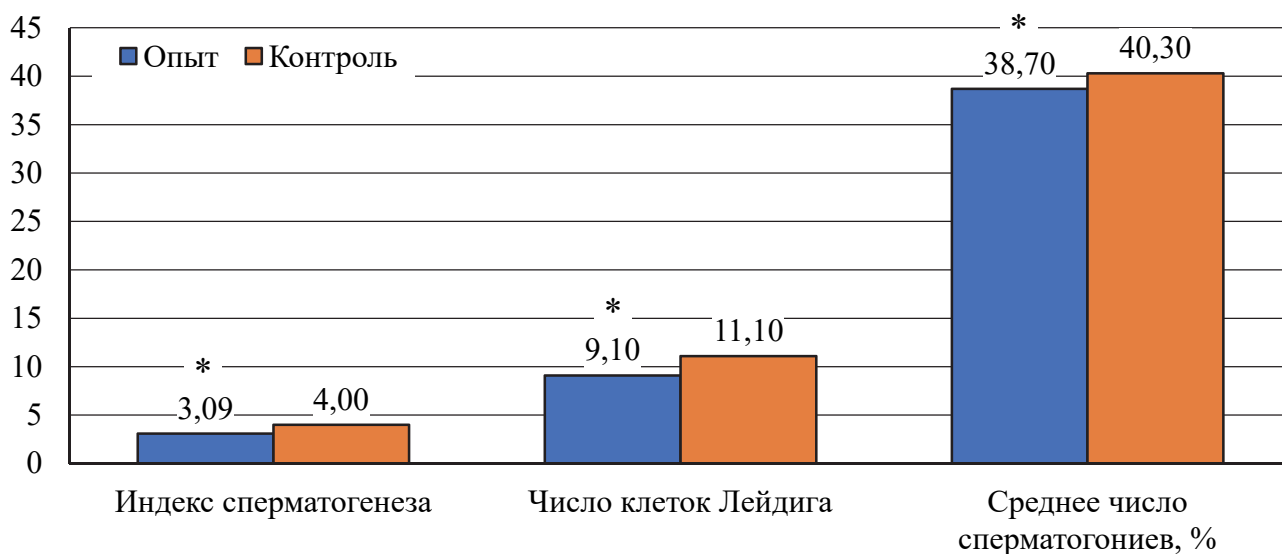


Рисунок 2 – Результаты морфометрического исследования семенников белых крыс, подвергавшихся воздействию дыма: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$

В современной литературе данные о влиянии дыма природных пожаров на репродуктивный потенциал у животных крайне малочисленны и сосредоточены в основном на исследованиях в период беременности. Показано, что при нахождении в условиях сильной задымлённости от природных пожаров в период беременности у приматов повышается риск преждевременных родов и снижения жизнеспособности потомства (Willson et al., 2021). Экспериментальными исследованиями Д. М. Горбатовой и соавт. (2014) выявлено, что экспозиция торфяным дымом в пренатальный период вызывала снижение прироста массы тела беременных крыс, увеличение постимплантационной гибели, снижение массы и увеличение числа гематом и кровоизлияний у плодов, а также увеличение двигательной активности и нарушение ориентировочно-исследовательского поведения половозрелого потомства при повторных тестированиях. Учитывая, что эмбриональные предшественники гамет являются первичными зародышевыми клетками (Donovan, 1998), воздействие химических факторов в пренатальный период не исключает воздействия на весь фолликулярный запас и непосредственное влияние на плод.

4.2. Характеристика состояния потомства, полученного от белых крыс, сразу после окончания воздействия дымом лесного пожара

Анализ постнатальной смертности показал, что среди крысят от контрольных особей случаи мертворождения не наблюдались, тогда как среди потомства экспонированных самок и самцов данные показатели составили 27,8 и 29,4 % соответственно. Кроме того, у потомства опытных самок наблюдалось значительное повышение частоты случаев летальных исходов в первую неделю жизни (7,9 %) по сравнению с контрольной группой, где случаи гибели после родов не превышали 2,4 %. Смертность потомства опытных самцов в первую неделю жизни составила 3,6 %. Суммарно смертность потомства опытных самок составила 35,7 %, смертность потомства опытных самцов – 33 %. Результаты исследования показателей поведения потомства крыс, полученных при спаривании непосредственно после воздействия дыма лесного пожара, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели поведения потомства экспонированных дымом крыс, Me (LQ ; UQ)

Показатели	Варианты исследования			
	Потомство, полученное от экспонированных самцов		Потомство, полученное от экспонированных самок	
	Самцы ($n = 20$)	Самки ($n = 20$)	Самцы ($n = 20$)	Самки ($n = 20$)
ГДА	<u>54,5 (51,0; 57,0)</u>	<u>66,0 (55,0; 74,0)</u>	<u>55,5 (40,0; 59,0)</u>	<u>51,5 (50,0; 52,0)</u>
	38,0 (24,0; 51,0)	65,0 (54,0; 74,0)	38,0 (24,0; 51,0)	65,0 (54,0; 74,0)
ВДА	<u>13,0 (12,1; 17,0)</u>	<u>8,0 (7,0; 10,0)</u>	<u>9,0 (6,0; 13,0)</u>	<u>13,5 (10,0; 15,0)</u>
	13,0 (12,0; 13,0)	11,0 (8,0; 14,0)	13,0 (12,0; 13,0)	11,0 (8,0; 14,0)
ЭР	<u>39,4 (32,8; 51,1)**</u>	<u>38,2 (33,7; 47,7)**</u>	<u>38,8 (26,3; 45,1)*</u>	<u>40,0 (29,6; 47,5)**</u>
	16,5 (8,1; 21,2)	5,8 (3,3; 8,4)	16,5 (8,1; 21,2)	5,8 (3,3; 8,4)
$K_{опа}$	<u>149 (133; 154)*</u>	<u>148 (130; 155)</u>	<u>178 (176; 179)</u>	<u>177 (175; 178)</u>
	177 (174; 178)	177 (176; 180)	177 (174; 178)	177 (176; 180)
КП	<u>2,2 (1,6; 2,6)**</u>	<u>2,4 (1,3; 2,6)**</u>	<u>2,4 (1,9; 3,5)</u>	<u>2,2 (1,9; 2,7)**</u>
	4,6 (3,1; 9,4)	15,3 (10,8; 29,7)	4,6 (3,1; 9,4)	15,3 (10,8; 29,7)

Примечание: под чертой – показатели соответствующей контрольной группы; * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$, ** – при $p \leq 0,01$

Наиболее выраженные изменения произошли у потомства, полученного при спаривании самцов с интактными самками. Как у самцов, так и у самок из полученного потомства наблюдалось резкое снижение ориентировочно-исследовательской активности. Обычно после попадания животного в новую обстановку у него преобладает ориентировочно-исследовательский рефлекс (Беляев и др., 2012), однако в нашем исследовании грызуны не проявили характерного поведения, несмотря на несколько возросший объём паттернов горизонтальной двигательной активности. Кроме перемещения, в состав исследовательского

рефлекса также входят продолжительность акта обнюхивания и заглядывания в норки, что в полной мере не было реализовано у животных, отцы которых были экспонированы дымом. $K_{оиа}$, у животных обоего пола из потомства опытных групп был статистически значимо ниже такового у животных контрольных групп ($p = 0,024$ и $p = 0,0012$ соответственно). Эмоциональная реактивность потомства, полученного от экспонированных животных, была с высоким уровнем значимости выше, чем таковая у особей контрольной группы. Особенно ЭР возросла у самок и превысила таковую у самок контрольной группы в 6,6 раза ($p = 0,0005$); у самцов ЭР была выше в 2,4 раза, чем в соответствующей контрольной группе ($p = 0,001$). Эмоциональная реактивность изменяется при действии на животного физических факторов, а также при поступлении в организм различных токсичных веществ, что обычно связано с появлением сильного страха или свидетельствует о повышении уровня возбуждения животных. От 2 до 6 раз снизился у животных опытных групп коэффициент подвижности с уровнем статистической значимости у самцов $p = 0,002$, у самок $p = 0,001$ по сравнению с таковым у потомства контрольной группы. В целом наблюдаемые изменения свидетельствовали о нарушении баланса оборонительной реакции, связанной с возникновением страха и исследовательской реакции, направленной на ознакомление животного с новой средой у особей, родители которых были экспонированы дымом лесного пожара. При обучении потомства в водном лабиринте Морриса установлено повышение латентного периода поиска скрытой платформы у самцов из потомства, полученного от экспонированных дымом самцов по сравнению с контролем (26,3 (21,8; 34,5) и 18,0 (10,3; 23,2) с соответственно; $p = 0,037$), что может свидетельствовать о снижении когнитивных способностей данных особей, выразившихся в нарушении показателей пространственной памяти и способности навигационному научению. У самок из потомства данный показатель был также выше, чем в контрольной группе, но не достигал уровня статистической значимости ($p = 0,061$). Потомство экспонированных самок не демонстрировало снижения когнитивного потенциала.

При проведении макроскопического и морфометрического исследования нервной ткани головного мозга потомства, полученного при спаривании экспонированных животных с интактными партнёрами сразу после окончания воздействия дымом природного пожара, не выявлено статистически значимых отличий при сравнении с контролем.

Таким образом, при обследовании половозрелого потомства первого поколения выявлен трансгенерационный эффект экспозиции дымом, проявляющийся в виде изменений структуры поведения. Особи из полученного потомства демонстрировали ярко выраженные однонаправленные нарушения целостной структуры поведения при отсутствии половых различий; их поведение характеризовалось значительным снижением двигательной и исследовательской активности на фоне повышения уровня негативного эмоционального состояния. Существуют убедительные доказательства того, что воздействие на отцов таких факторов окружающей среды, как стресс и физическая нагрузка, может повлиять на здоровье потомства. Полученные данные согласуются с результатами исследования Saavedra-Rodriguez, Feig (2013), в котором показано, что хронический социальный стресс у самцов мышей в подростковом и раннем взрослом возрасте может вызвать социальный дефицит и повышенное тревожное поведение у потомков женского пола. Кроме того, имеются сведения, свидетельствующие о влиянии длительного стресса отцов на изменения в репродуктивной системе и последующей дисрегуляции стрессового ответа у потомства (Short et al., 2016). В то же время в литературе имеются данные о том, что физическая нагрузка самцов белых крыс до спаривания оказывает влияние на память и обучение, нейропластичность и уровни метилирования ДНК в гиппокампе у потомства мужского пола при отсутствии значительных изменений глобального метилирования ДНК сперматозоидов (Spindler et al., 2019).

4.3. Состояние центральной нервной системы белых крыс сразу после окончания воздействия дымом лесного пожара

Исследование показателей поведения и когнитивных способностей животных, подвергавшихся воздействию дыма, позволило объективно оценить эффект воздействия

продуктов горения, выделяющихся при лесных пожарах, на показатели нервной системы. Изменения в структуре поведения животных, экспонированных дымом, характеризовались значительным снижением двигательной и исследовательской активности. Так, в группах опытных самцов и самок наблюдалось статистически значимое снижение коэффициента подвижности ($p = 0,02$ и $p = 0,0001$ соответственно) по сравнению с соответствующими показателями группы контроля, что свидетельствовало об усилении у данных особей состояния стрессированности при попадании в незнакомую обстановку. Кроме того, показатель эмоциональной реактивности был с высоким уровнем статистической значимости больше по сравнению с таковым у особей контрольной группы в 1,6 раза ($p = 0,01$) у самцов и в 3,9 раза ($p = 0,01$) – у самок. Данный показатель, состоящий из эпизодов замирания и неподвижности животного, свидетельствовал о повышении уровня тревожности у экспонированных дымом особей. Одновременно последствием экспозиции продуктами горения у самок белых крыс являлось значительное снижение уровня ориентировочно-исследовательской активности ($p = 0,001$; Таблица 3) по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3 – Результаты тестирования белых крыс, подвергавшихся воздействию дыма, в «открытом поле», Ме (LQ; UQ)

Показатели	Варианты исследования			
	Самцы		Самки	
	Опыт ($n = 30$)	Контроль ($n = 30$)	Опыт ($n = 30$)	Контроль ($n = 30$)
ЭР	32 (24; 35)**	20 (15; 25)	51 (34; 64)**	13 (10; 20)
К _{оиа}	150 (137; 157)	157 (152; 165)	130 (117; 145)**	163 (160; 168)
КП	2,5 (2,3; 3,2)**	3,6 (3,1; 5,0)	1,3 (0,9; 2,3)**	7,1 (4,8; 9,7)

Примечание: ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,01$

Оценка показателей пространственной памяти и способности экспериментальных животных к навигационному научению осуществлялась с помощью водного лабиринта Морриса. Результаты исследования показали статистически значимое повышение латентного периода поиска скрытой платформы у экспонированных самок белых крыс по сравнению с контрольной группой (35,2 (35,0; 49,4) и 27,4 (16,8; 32,0) с соответственно; $p = 0,01$). Наблюдаемые изменения поведенческих реакций и когнитивных способностей у экспонированных животных позволили констатировать более высокую чувствительность самок белых крыс к действию дыма по сравнению с самцами.

При гистологическом исследовании ткани сенсомоторной коры головного мозга в образцах животных обоего пола, подвергавшихся воздействию дыма, обнаружены множественные очаги нейронофагии по сравнению с таковыми в группе контроля (Рисунок 3Б). Кроме того, отмечалось образование глиальных узелков и расширение периваскулярных пространств (Рисунок 3Б). В срезах ткани головного мозга контрольных животных указанные изменения отсутствовали либо носили единичный характер (Рисунок 3А).

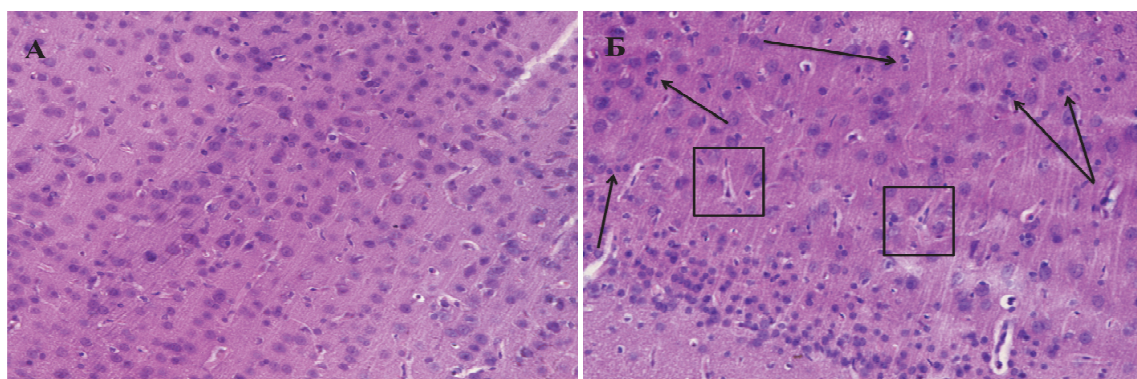


Рисунок 3 – Ткань головного мозга самцов белых крыс контрольной (А) и опытной (Б) групп сразу после воздействия дымом; окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 400$:

↑ – нейронофагия; □ – полнокровные сосуды с расширением периваскулярных пространств

Результаты морфометрического исследования показали, что при воздействии воздушной смеси, имитирующей по показателям концентрации основных поллютантов лесной низовой пожар, как у самок, так и у самцов белых крыс наблюдалось статистически значимое снижение количества нормальных нейронов и глиальных клеток на единицу площади, а также повышение числа дегенеративно изменённых нейронов и актов нейронофагии по сравнению с соответствующими группами контроля (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты морфометрического исследования головного мозга белых крыс, Me (LQ; UQ)

Варианты исследования	Показатели			
	Число нормальных нейронов	Число дегенеративно изменённых нейронов	Число глиальных клеток	Число актов нейронофагии
Самцы, опыт	165,5 (143; 239)**	12,5 (8; 17)**	176 (154;196)**	5 (2; 9)**
Самцы, контроль	268 (249; 299)	1,5 (0; 3)	208,5 (199; 299)	1 (0; 2)
Самки, опыт	119,5 (98; 139)**	14 (7; 19)**	156 (146; 167)**	2,5 (1; 5)
Самки, контроль	195 (179; 233)	3 (1; 8)	196 (156; 226)	2 (1; 4)

Примечание: ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,01$; количество животных в каждой группе $n = 8$

Указанные морфоструктурные изменения сенсомоторной коры головного мозга опытных крыс, вероятно, являются основой нарушений видоспецифического поведения лабораторных животных при экспозиции продуктами горения лесной биомассы.

В настоящее время механизмы неблагоприятного влияния некоторых компонентов дыма (например, CO, CO₂ и др.) на организм человека и животных при вдыхании общеизвестны, однако их токсические эффекты зачастую оценены независимо друг от друга без учёта возможного комбинированного действия. Так, показано, что накопление CO₂ приводит к гиперкапнии и респираторному ацидозу, вследствие чего активируются области мозга, ионные каналы и нейротрансмиттеры, участвующие в формировании негативных эмоциональных реакций у крыс (Amendola, Weary, 2020). В исследованиях Aikawa с соавторами (1990) выявлены половые различия в оперантном поведении у взрослых крыс после однократного воздействия окиси углерода.

4.4. Характеристика состояния белых крыс в отдалённом периоде после воздействия дыма лесного пожара

Анализ результатов проведённого исследования показал, что продукты горения, выделяющиеся при лесных пожарах, в большей степени оказывают негативное воздействие на показатели мужского репродуктивного потенциала, о чём свидетельствовали значительное угнетение процесса сперматогенеза и более выраженные отклонения поведенческих реакций у их потомства. Вследствие этого на следующем этапе была поставлена задача оценить стойкость выявленных нарушений при обследовании в отдалённом периоде, сопоставимом по длительности с периодом сперматогенеза у крыс, общая продолжительность которого составляет 50–60 дней (Aslam et al., 1999).

По условиям нашего эксперимента повторное обследование самцов, подвергавшихся ингаляционному воздействию дымом, проводили в отдалённом периоде, через 60 дней после окончания ингаляций. К этому сроку у животных должен пройти полный сперматогенный цикл, и возникшие нарушения структуры семенников должны нивелироваться. Действительно, в отдалённом периоде обследования наблюдалась нормализация показателей морфологической структуры сперматогенного эпителия у животных, подвергавшихся воздействию дыма.

Результаты исследования показателей поведения и когнитивных способностей крыс-самцов родительского поколения свидетельствовали об отсутствии полного восстановления

структуры поведения в отдалённом периоде. Так, выявлено снижение коэффициента ориентировочно-исследовательской активности ($p = 0,002$) и повышение уровня ЭР по сравнению с группой контроля ($p = 0,003$; Таблица 5).

Таблица 5 – Показатели поведения белых крыс в отдалённом периоде после интоксикации дымом лесного пожара, Ме (LQ; UQ)

Показатели	Варианты исследования	
	Самцы, опыт ($n = 30$)	Самцы, контроль ($n = 30$)
ЭР	58,5 (51,3; 72,9)**	32,5 (26,6; 41,1)
К _{оиа}	123,5 (110,9; 131,5)**	148,0 (138,5; 157,0)
КП	0,5 (0,6; 1,5)	1,8 (0,9; 2,2)

Примечание: ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,01$

Результаты гистологического исследования показали, что в отдалённом периоде сохраняются индуцированные дымом лесного пожара нарушения морфологической структуры сенсомоторной коры головного мозга животных. Выявлено статистически значимое снижение количества нормальных нейронов и глиальных клеток на единицу площади наряду с повышением числа дегенеративно изменённых нейронов и актов нейронофагии по сравнению с соответствующими показателями группы контроля (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты морфометрического исследования головного мозга белых крыс в отдалённом периоде после интоксикации дымом лесного пожара, Ме (LQ; UQ)

Показатели	Варианты исследования	
	Самцы, опыт	Самцы, контроль
Число нормальных нейронов	193,5 (167; 221)**	254 (215,5; 271)
Число дегенеративно изменённых нейронов	11 (9; 12)**	1 (0; 2)
Число глиальных клеток	165 (135; 185)**	204,5 (196; 210)
Количество актов нейронофагии	4 (2; 5)**	1 (0; 1,5)

Примечание: ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,01$; количество животных в каждой группе $n = 8$

Обследование в водном лабиринте Морриса не выявило статистически значимых нарушений когнитивных способностей животных. Изучаемые показатели латентного периода поиска скрытой платформы не отличались от таковых в контрольной группе.

При обследовании потомства, полученного при спаривании в отдалённом периоде опытных самцов с интактными самками, выявлены гендерные различия, заключающиеся в изменении изучаемых показателей только у самок. У них наблюдалось повышение ВДА ($p = 0,032$), что может свидетельствовать о повышении уровня тревожности у самок по сравнению с самцами из данной группы. Также при тестировании в водном лабиринте Морриса среди данных особей 35 % не справились с тестом, то есть не смогли найти платформу за 4 попытки ($p = 0,009$; критерий Фишера). Гистологическое обследование ткани коры головного мозга у потомства обоего пола не показало статистически значимых изменений.

В целом полученные нами результаты экспериментального исследования свидетельствуют о том, что при воздействии дыма лесного пожара происходит нарушение репродуктивного потенциала, выражавшееся в снижении индекса сперматогенеза, сокращении процентного содержания сперматогониев, а также в снижении относительного количества клеток Лейдига и нарушении циклической функции яичников белых крыс. Кроме того, инициируются патологические процессы в нервной ткани животных, приводящие к стойким нарушениям структуры видоспецифического поведения. Проведённые исследования позволяют высказать утверждение о том, что нарушения мужского репродуктивного потенциала при длительном воздействии дымом природного пожара являются первичным звеном в процессе нарушений нейробиологии поведения потомства. В то же время можно

заклучить, что восстановительный период длительностью 2 месяца, безусловно, играет важную роль в предупреждении негативных эффектов экспозиции дымом у потомства.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОЛОВЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ РОДИТЕЛЬСКОГО ПОКОЛЕНИЯ И ИХ РОЛИ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ У ПОТОМСТВА

5.1. Сравнительная характеристика уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках нервной ткани, половых клетках и крови белых крыс после воздействия дыма лесного пожара

Результаты проведённого исследования показали, что исследованные образцы крови, мозга, семенников и яичников имеют разный уровень метилирования ДНК как в норме, так и после воздействия дымом лесного пожара. Сразу после окончания воздействия дыма лесного пожара выявлено статистически значимое повышение уровня полногеномного метилирования в крови самцов белых крыс на 46,7 % ($p = 0,02$; Таблица 7). У самок повышение данного показателя имело характер тенденции ($p = 0,06$; Таблица 6). Изменений уровня полногеномного метилирования в тканях мозга и гонад экспонированных животных не выявлено.

Таблица 7 – Уровень полногеномного метилирования ДНК в клетках крови, нервной ткани и гаметах белых крыс сразу после окончания воздействия дыма лесного пожара, %, Me (LQ; UQ)

Показатели	Варианты исследования	
	Самцы	Самки
Кровь	<u>63,8 (60,2; 79,1)*</u>	<u>57,4 (50,7; 65,9)</u>
	43,5 (32,9; 54,9)	48,3 (37,3; 52,3)
Мозг	<u>58,7 (50,3; 70,9)</u>	<u>41,6 (25,5; 59,7)</u>
	44,1 (29,7; 52,2)	31,8 (24,0; 56,5)
Гаметы	<u>60,0 (45,2; 71,0)</u>	<u>62,7 (42,1; 67,6)</u>
	48,8 (34,7; 54,4)	42,2 (25,3; 51,2)

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$; под чертой – показатели контрольной группы; количество животных в каждой группе $n = 10$

В отдалённом периоде после воздействия дымом лесного пожара статистически значимых отличий по уровню полногеномного метилирования ДНК во всех исследуемых биообразцах от экспонированных животных не выявлено.

Несмотря на наличие в составе дыма лесных пожаров веществ с мутагенной и канцерогенной активностью (Ewa, Danuta, 2017; Kopp et al., 2018; Liu et al., 2018; Muthusamy et al., 2018), воздействие дыма лесных пожаров не вызвало изменений уровней полногеномного метилирования ДНК в половых клетках белых крыс. В то же время в клетках крови животных сразу после окончания экспозиции выявлено гиперметилирование ДНК по сравнению с контролем. Наличие изменений уровня полногеномного метилирования ДНК в крови у животных и их отсутствие в половых клетках, по нашему мнению, могут быть обусловлены как защитными свойствами гематотестикулярного барьера в семенниках (Miller, Cherrington, 2018), так и недостаточными для развития ответа организма уровнем и сроком воздействия токсичных компонентов дыма. Так, в исследовании Schuller (2021) показано, что при более длительном воздействии дыма от тления хвой пихты (40 дней) возникают изменения уровня метилирования ДНК сперматозоидов у взрослых мышей. Кроме того, при отсутствии изменений уровня полногеномного метилирования ДНК в половых клетках родительского поколения можно предположить, что эпигенетические модификации ДНК могли произойти на уровне отдельных генов, что определяет необходимость более углублённого исследования выявленных фактов.

5.2. Оценка прогностического значения уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови экспонированных дымом животных

В результате проведённого исследования в условиях экспериментального моделирования получен комплекс данных о влиянии дыма лесного пожара на показатели видоспецифического поведения, когнитивных функций, морфоструктурных изменений сенсомоторной коры головного мозга, а также репродуктивного потенциала и эпигенетических модификаций ДНК в половых и соматических клетках белых крыс. С целью определения наиболее информативных показателей, которые в первую очередь обуславливают межгрупповые различия, был использован многофакторный дискриминантный анализ.

По результатам дискриминантного анализа из исходного комплекса признаков в модель были включены только два наиболее информативных показателя, позволивших разграничить животных, подвергавшихся воздействию дыма, и контрольных особей: a_1 – эмоциональная реактивность ($p = 0,0001$); a_2 – уровень полногеномного метилирования ДНК в крови (%) ($p = 0,0001$). В проанализированных нами выборках экспонированных крыс различия самок и самцов по данным показателям выражены слабо, что позволило проводить дальнейший анализ без разделения по половому признаку.

Дискриминантные функции D_1 и D_2 (корень 1 и корень 2) имели следующий вид:

$$D_1 = 0,29 \times a_1 + 0,56 \times a_2 - 24,5;$$

$$D_2 = 0,16 \times a_1 + 0,41 \times a_2 - 12,1,$$

где: D_1 и D_2 – значения дискриминантной функции; $(-)24,5$ и $(-)12,1$ – константы; a_1 и a_2 – числовые значения эмоциональной реактивности и уровня полногеномного метилирования ДНК в крови (%); 0,29; 0,56; 0,16 и 0,41 – коэффициенты, вычисленные с помощью дискриминантного анализа.

Для определения принадлежности неизвестных особей к одной из групп (экспонированных или неэкспонированных дымом) можно использовать данные дискриминантные функции. При использовании в данных уравнениях численных значений показателей эмоциональной реактивности и уровня метилирования ДНК в крови неизвестного объекта можно решить задачу классификации. Критерием определения групповой принадлежности неизвестной особи является максимальное из всех полученных значение классификационной функции.

Качество дискриминации оценено по графику распределения особей данных групп по значению дискриминантной функции, данным классификационной таблицы и матрицы межгрупповых расстояний Махаланобиса. Анализ значений искомой функции показал, что среднее значение центров распределения канонических величин у экспонированных дымом крыс составило $(-)1,09$, в группе контроля – $(+)1,31$ (Рисунок 4). Точность дискриминации экспонированных дымом животных составила 87,5 %, неэкспонированных – 85,0 %.

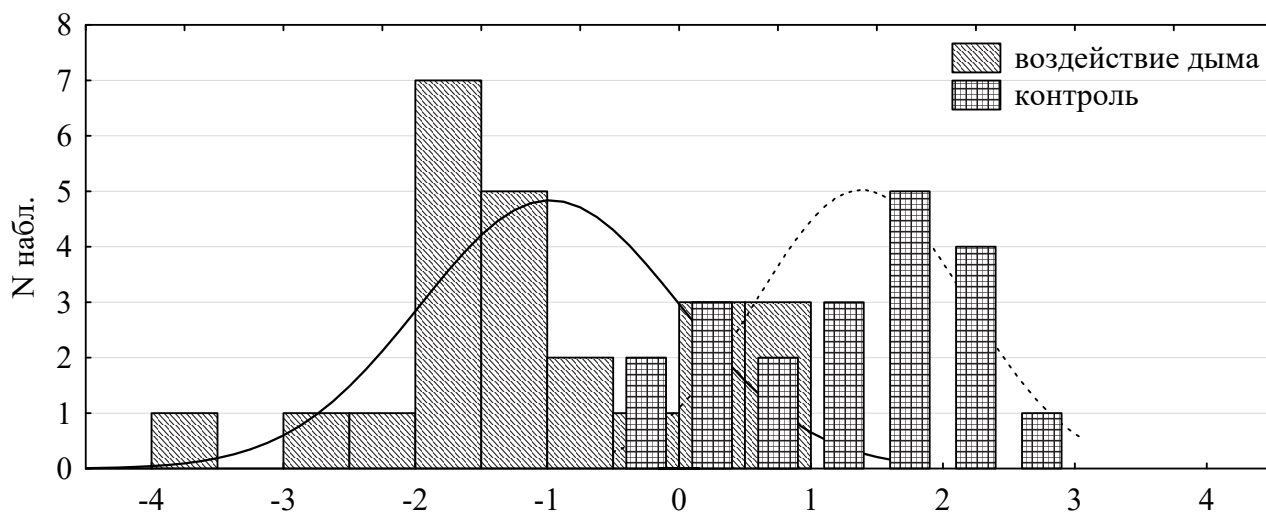


Рисунок 4 – Гистограмма распределения животных, экспонированных дымом, и контрольной группы по значению канонической дискриминантной функции

Таким образом, критериями, по которым можно дифференцировать животных, подвергавшихся воздействию дыма, из общей популяции, являлись не только показатели поведения, а именно их эмоциональной реактивности, но и показатели полногеномного метилирования ДНК в крови. В настоящее время особое внимание уделяется внедрению и разработке биотестов для оценки генотоксичности (Mutatox test, GreenScreen EM, метод ДНК-комет и др.), и в то же время известно, что эпигенетические изменения, индуцированные экологическими факторами, могут формировать фенотипические реакции, передаваться потомству и являются важным источником наследственной изменчивости (Jablonka, Lamb, 2008). Результаты проведенного исследования показали, что определение уровня метилирования ДНК в крови крыс может использоваться в практике биомониторинга в качестве дополнительного критерия биоиндикации, который будет отражать физиологические изменения у мелких млекопитающих вследствие лесных пожаров.

Кроме того, анализ результатов настоящего исследования позволяет предположить наличие связи между эпигенетическими изменениями у крыс, подвергавшихся воздействию продуктами горения, и развитием нарушений поведения их потомства. Проведение корреляционного и регрессионного анализов полученного массива данных позволило определить прогностическое значение уровня метилирования ДНК в клетках крови у родительского поколения при оценке показателей тревожности и двигательной активности у потомства. Выявлена высокозначимая умеренная корреляция между уровнем метилирования ДНК в клетках крови у родительского поколения с показателями тревожности у потомства («фризинг» $r = 0,41$; $t = 3,34$; $n = 57$; $p = 0,002$; Таблица 8; Рисунок 5А). При анализе зависимости коэффициента подвижности потомства от уровня полногеномного метилирования ДНК в крови родительского поколения была выявлена отрицательная связь данных показателей умеренной силы с высокой степенью статистической значимости ($r = -0,33$; $t = -2,61$; $n = 57$; $p = 0,012$; Таблица 8; Рисунок 5Б). Уровень эмоциональной реактивности потомства и уровень полногеномного метилирования ДНК крови родителей имели гораздо меньшую степень корреляционной связи ($r = 0,29$; $t = 2,23$; $n = 56$; $p = 0,029$; Таблица 8).

Проведение регрессионного анализа позволило оценить связь между уровнем метилирования ДНК в клетках крови у родительского поколения и показателями тревожности («фризинг»: $R^2 = 0,169$; «ЭР»: $R^2 = 0,085$) и двигательной активности у потомства («КП»: $R^2 = 0,112$). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что вклад уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови у родительского поколения в вариацию показателей поведения их потомства составил 8–17 %.

Таблица 8 – Результаты линейного регрессионного анализа

Показатели	Уровень полногеномного метилирования ДНК в клетках крови, %		
	Значение коэффициента корреляции r	Значение коэффициента детерминации R^2	Уровень статистической значимости p
Количество актов «фризинга»	0,41	0,169	0,002
Коэффициент подвижности	-0,33	0,112	0,012
Эмоциональная реактивность	0,29	0,085	0,030

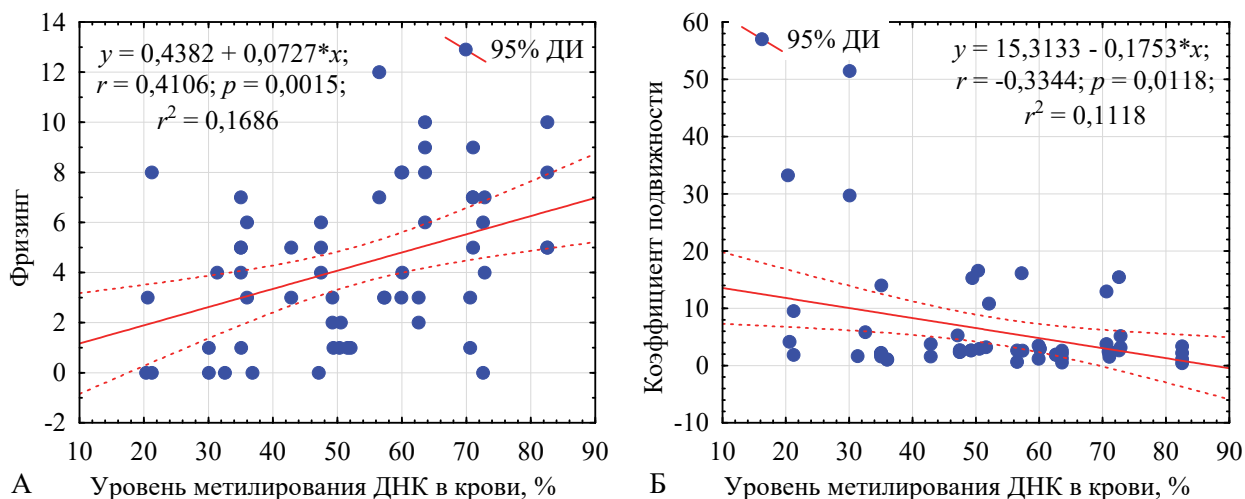


Рисунок 5 – Диаграммы рассеяния. Корреляционная связь уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови родительского поколения с показателями центральной нервной системы потомства: А – фризинг; Б – коэффициент подвижности

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе экспериментального исследования нами показано, что дым лесного пожара оказывает существенное влияние на мелких млекопитающих. Выявлены нарушения функционального состояния мужского репродуктивного потенциала, выразившиеся в снижении индекса сперматогенеза, сокращении процентного содержания сперматогониев, а также в снижении относительного количества клеток Лейдига. Результаты морфометрического исследования яичников свидетельствуют о большей резистентности репродуктивной системы самок к воздействию дыма лесного пожара по сравнению с самцами. У животных, подвергавшихся воздействию дыма, выявлены нарушения нейробиологии поведения, характеризующиеся снижением двигательной и исследовательской активности, нарушением когнитивных способностей. При этом в структуре ткани сенсомоторной коры головного мозга обнаружены множественные очаги нейрофагии, увеличение количества дегенеративно изменённых нейронов, образование глиальных узелков и расширение периваскулярных пространств. У потомства первого поколения, полученного от белых крыс при спаривании непосредственно после завершения воздействия дыма, выявлены снижение выживаемости и стойкие изменения структуры поведения, что даёт возможность прогнозировать динамику численности данной популяции на определённый период времени, а также может свидетельствовать о снижении биотического потенциала данного вида в будущем. Отдалённый период длительностью 60 дней, сопоставимый со сроком сперматогенеза у крыс, является важным фактором в восстановлении мужской генеративной функции и предупреждении негативных эффектов экспозиции дымом у потомства, однако не является достаточным для нормализации поведенческих реакций экспонированных дымом животных. Воздействие дыма лесного пожара приводит к повышению уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови белых крыс при отсутствии изменений данного показателя в тканях мозга и гонад. Уровень полногеномного метилирования ДНК в крови может использоваться в практике экологического мониторинга в условиях лесных пожаров в качестве дополнительного критерия биоиндикации, отражающего физиологические изменения у мелких млекопитающих.

ВЫВОДЫ

1. При проведении качественного анализа дыма, выделяющегося при горении биомассы, взятой на территории бореальных лесов Прибайкальского национального парка, в воздухе экспозиционной камеры идентифицировано 30 соединений различных классов: гетероциклические альдегиды, терпены, производные терпена, ароматические углеводороды и фенолы. Отмечено значительное выделение фурфурола, α -пинена, 5-метил-2-фуральдегида, лонгифолена, δ -кадинена, ацетальдегида, формальдегида, пропионового альдегида и диацетила. Концентрации CO, PM_{2,5}, бензола, фурфурола и ацетальдегида составили $27,5 \pm 1,2$, $1,9 \pm 0,5$, $0,18 \pm 0,06$ и $0,65 \pm 0,12$ мг/м³, что превышает предельно допустимые максимальные разовые концентрации в 5,5, 11,8, 1,3, 3,6 и 65 раз соответственно.

2. Дым лесного пожара вызывает нарушение функционального состояния половых гонад мелких млекопитающих, которое проявляется в снижении индекса сперматогенеза на 22,7 % и нарушении циклической функции яичников. Восстановление показателей сперматогенеза у экспонированных дымом животных наблюдается после завершения полного цикла сперматогенеза, что играет важную роль в предупреждении негативных эффектов экспозиции дымом у потомства.

3. Экспозиция продуктами горения лесной биомассы приводит к снижению выживаемости потомства первого поколения на 32–37 %, а также к нарушению у него в половозрелом возрасте видоспецифического поведения, выражающегося в снижении двигательной и исследовательской активности, повышении уровня негативного эмоционального состояния и нарушении пространственной памяти.

4. Воздействие дыма на мелких млекопитающих сопровождается снижением двигательной и исследовательской активности, нарушением когнитивных способностей на фоне нейродегенеративных изменений ткани коры головного мозга. Более чувствительными к воздействию дыма являются самки.

5. У особей мужского пола, подвергавшихся воздействию дыма лесного пожара, выявлено повышение уровня полногеномного метилирования ДНК в клетках крови на 46,7 %, что может служить критерием биоиндикации неблагоприятного воздействия дыма лесных пожаров.

6. Снижение двигательной активности и повышение эмоциональной реактивности у потомства на 8–17 % могут быть обусловлены эпигенетическими модификациями у родительского поколения, индуцированными токсическими компонентами дыма.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

В журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России:

1. Экспериментальная оценка влияния дыма лесных пожаров на репродуктивную функцию мелких млекопитающих и их потомство / В. А. Вокина, М. А. Новиков, А. Н. Алексеенко, Л. М. Соседова, Е. А. Капустина, Е. С. Богомоллова (Андреева) [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2019. – Т. 29. – С. 88–98. DOI: 10.26516/2073–3372.2019.29.88

2. Андреева, Е. С. Оценка отдаленных последствий воздействия дыма природных пожаров на белых крыс / Е. С. Андреева // Медицина труда и промышленная экология. – 2020. – № 11. – С. 720–722. DOI: 10.31089/1026-9428-2020-60-11-720-722

3. Нарушение репродуктивного потенциала самцов белых крыс при воздействии дыма природного пожара / В. А. Вокина, Е. А. Капустина, М. А. Новиков, Е. С. Андреева // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2021. – № 1. – С. 70–76. DOI: 10.17072/1994-9952-2021-1-70-76

4. Reproductive function of male rats and motor activity of their offspring in fire emissions modeling / L. M. Sosedova, V. A. Vokina, M. A. Novikov, E. S. Andreeva [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – Vol. 172, № 4. – P. 472–477. DOI: 10.1007/s10517-022-05416-3

В журналах, индексируемых в международной базе Web of Science:

5. Paternal biomass smoke exposure in rats produces behavioral and cognitive alterations in the offspring / L. M. Sosedova, V. A. Vokina, M. A. Novikov, O. M. Zhurba, A. N. Alekseenko, V. S. Rukavishnikov, E. S. Andreeva // *Toxics*. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 1–11. DOI: 10.47470/0016-9900-2021-100-11-1224-1228

6. Alterations in CNS functions and DNA methylation in rats after 24 h exposure to peat smoke / V. A. Vokina, L. M. Sosedova, M. A. Novikov, V. S. Rukavishnikov, E. S. Andreeva [et al.] // *Toxics*. – 2021. – Vol. 9, № 12. – P. 342. DOI: 10.3390/toxics9120342

В прочих изданиях:

7. Методические подходы к моделированию последствий природных пожаров / В. А. Вокина, А. Н. Алексеенко, Т. А. Елфимова, М. А. Новиков, Е. С. Богомолова (Андреева) // *Современные проблемы оценки, прогноза и управления экологическими рисками здоровью населения и окружающей среды, пути их рационального решения: Материалы III Международного форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды (13–14 декабря 2018 г.)*. – М., 2018. – С. 64–68.

8. Андреева, Е. С. Полногеномное метилирование ДНК в клетках мозга и крови потомства белых крыс, подвергавшихся воздействию продуктов горения / Е. С. Андреева // *Современные проблемы биологии, экологии и почвоведения: Материалы Международной научной конференции, посвященной 100-летию высшего биологического образования в Восточной Сибири (19–20 сентября 2019 г.)*. – Иркутск: ИГУ, 2019. – С. 28–30.

9. Исследование воздействия эмиссии от лесных пожаров на морфофункциональное состояние центральной нервной системы белых крыс / В. А. Вокина, М. А. Новиков, Т. А. Елфимова, Е. С. Богомолова (Андреева) [и др.] // *Гигиена и санитария*. – 2019. – Т. 98, № 11. – С. 1245–1250. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-11-1245-1250

10. Исследование последствий экспозиции продуктами горения на ЦНС белых крыс в условиях экспериментального моделирования природного ландшафтного пожара / В. А. Вокина, Т. А. Елфимова, А. Н. Алексеенко, М. А. Новиков, Е. С. Богомолова (Андреева) // *Перспективы развития биомедицинских технологий в Байкальском регионе: Сборник тезисов Международной научной конференции (5–8 февраля 2019 г.)*. – Иркутск: Институт географии им. В. Б. Сочавы СО РАН, 2019. – С. 13–14.

11. Эпигенетические изменения как маркер воздействия продуктов горения от лесных пожаров / Богомолова (Андреева) Е.С., Алексеенко А.Н., Елфимова Т.А., Новиков М.А., Вокина В.А. // *Богатство России: Сборник докладов II Всероссийского форума научной молодежи (10–11 декабря 2018 г.)*. – М.: МГТУ имени Н. Э. Баумана (Национальный исследовательский университет), 2019. – С. 195–196.

12. Андреева, Е. С. Отдаленные эффекты воздействия дыма природных пожаров на потомство белых крыс / Е. С. Андреева // *Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных территорий: Материалы III Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (24 апреля 2020 г.)*. – Иркутск: ИГУ, 2020. – С. 25–27.

13. Экспериментальное исследование гонадотоксического эффекта дыма лесных пожаров / М. А. Новиков, В. А. Вокина, Е. С. Андреева [и др.] // *Гигиена и санитария*. – 2020. – Т. 99, № 10. – С. 1149–1152. DOI: 10.47470/0016-9900-2020-99-10-1149-1152

14. Андреева, Е. С. Assessment of long-term effects of wildfire smoke in rats / Е. С. Андреева // *Science Present and Future: Research Landscape in the 21st century: Материалы конференции (19 мая 2021 г.)*. – Иркутск: ФГБУН «ИНЦ Сибирского отделения Российской академии наук», 2021. – С. 20–21.

15. Влияние дыма лесных пожаров на состояние центральной нервной системы крыс / Л. М. Соседова, В. А. Вокина, М. А. Новиков, Е. С. Андреева [и др.] // *Гигиена и санитария*. – 2021. – Т. 100, № 11. – С. 1224–1228. DOI: 10.47470/0016-9900-2021-100-11-1224-1228

16. Капустина, Е. А. Повреждение ДНК в тканях белых крыс при воздействии дыма лесных пожаров / Е. А. Капустина, В. А. Вокина, Е. С. Андреева // Журнал медико-биологических исследований. – 2021. – Т. 9, № 3. – С. 335–342. DOI: 10.37482/2687-1491-Z071

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВДА – вертикальная двигательная активность
ВСИМЭИ – Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований
ГДА – горизонтальная двигательная активность
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
K_{оиа} – коэффициент ориентировочно-исследовательской активности
КП – коэффициент подвижности
ЭР – эмоциональная реактивность

Андреева Елизавета Сергеевна

ВЛИЯНИЕ ДЫМА ЛЕСНОГО ПОЖАРА НА СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ У МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук