

УДК 576.385

**Кузина Т.В.**

*Астраханский государственный университет*

**ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ЯДРА ЭРИТРОЦИТОВ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРОМЫСЛОВЫХ РЫБ  
ВОЛГО-КАСПИЙСКОГО КАНАЛА\***

**T. Kuzina**

*Astrakhan State University*

**CHANGES IN THE STRUCTURE OF THE NUCLEU ERYTHROCYTES  
PERIPHERAL BLOOD IN FISH SPECIES VOLGA-CASPIAN CHANNEL**

*Аннотация.* В работе приводится анализ частоты встречаемости эритроцитов периферической крови с отклонениями в структуре ядра промысловых видов рыб Волго-Каспийского канала. Цитопатологические изменения структуры ядра рассматриваются как следствие развития дегенеративных процессов в организме, обусловленных комплексным воздействием экзогенных и эндогенных факторов. Уровень цитопатологических изменений структуры ядра может служить индикатором состояния организма рыб, его адаптационных возможностей.

*Ключевые слова:* эритроциты, микроядра, кариорексис, кариолиз.

*Abstract.* The paper provides an analysis of frequency of occurrence of peripheral blood erythrocytes with abnormal structure of the nucleus of commercial fish species of the Volga-Caspian channel. Tsitopatologicheskieskie structure changing of the nucleus is considered as a consequence of degenerative processes in the body due to the complex influence of exogenous and endogenous factors. Tsitopatologicheskikh changing level in nuclear structure can serve as a fish organism state indicator, its adaptive capacity.

*Key words:* erythrocytes, micronucleus, karyorhexis, karioliz.

Объективную информацию о цитопатологических процессах, происходящих в ответ на воздействие стрессирующих факторов среды, можно получить при анализе отклонений от нормальной конфигурации интерфазного ядра. Разнообразные цитопатологические изменения структуры ядра указывают на развитие дегенеративных процессов в организме рыб, обусловленных влиянием токсикантов, механических, физических и других воздействий. Волго-Каспийский канал испытывает значительное антропогенное воздействие. Канал рассчитан на двустороннее движение судов, длиной до 123 м и осадкой 4,2 м. Протяженность канала 188 км. Значительная его часть располагается в пределах устьевого взморья реки Волги. Современными исследователями [14, 12] показано, что среди загрязнителей водоёмов особую опасность представляют стабильные вещества, способные накапливаться (кумуляироваться) в организме. К таким соединениям относятся: хлорорганические соединения, полихлорбифенилы, гексахлорциклогексан, тяжелые металлы, нефть, нефтепродукты и другие. Среди токсикантов вод дельты Волги преобладают углеводороды естественного и антропогенного генезиса [9,122]. Содержание нефтеуглеводородов в водотоках дельты реки Волги находится на уровне 3,2 ПДК. При этом повышенный уровень нефтеуглеводородов отмечен в воде Волго-Каспийского канала (6,4 ПДК), что обусловлено усилением судходства, перевозками нефтепродуктов и размещением в прибрежной зоне предприятий, занимающихся перекачкой нефтеуглеводородов [9, 130].

---

\* © Кузина Т.В.

К числу цитопатологических изменений относятся: кариорексис (распад хроматина на конденсированные глыбки), хроматинолиз (в том числе появление кольцеобразных ядер), кариолиз (растворение ядра) с явлениями близкими фрагментозу (ареол хроматина вокруг ядра, «протуберанцы» кариоплазмы во внутриклеточное пространство) и другие [2, 71; 3, 17, 47; 18, 71]. Компоненты загрязнения природных вод могут обладать генотоксическими свойствами, вступать во взаимодействие с ДНК клеток, вызывая генные, геномные мутации, хромосомные перестройки. Оценить степень воздействия токсикантов на структуру хромосом и выявить генетические изменения у единичной особи или группы особей позволяет учет частоты образования микроядер, микроядерный тест [8, 247-248]. Микроядро (нем. Kleinkern; англ. micronucleus) – мелкое избыточное ядро, образуемое отдельными хромосомами или их фрагментами, которые в митозе (или мейозе) отделились от остальных и остались лежать в цитоплазме [15, 230]. Как правило, микроядра, локализованные в одной клетке, отличаются по размерам в зависимости от содержания в них ДНК; при этом ДНК способна к репликации и время репликации в различных микроядрах не совпадает [8, 250-251; 23, 123]. Микроядра служат индикаторами грубых поломок хромосом, а также существенных нарушений в структуре центромеры или митотического аппарата деления.

*Цель исследования.* Анализ типов цитопатологических изменений форменных элементов крови и частоты возникновения микроядер в эритроцитах периферической крови рыб Волго-Каспийского канала.

#### Материал и методы исследования

Объект исследования – эритроциты периферической крови половозрелых особей мужского и женского пола: судака (*Stizostedion lucioperca*) и леща (*Abramis brama*). Вылов рыб для анализа производился весной и осенью на тонево-м участке Волго-Каспийского кана-

ла в дельте реки Волги. Особи рыб для анализа не имели видимых внешних повреждений и проявлений каких-либо заболеваний. Периферическую кровь отбирали прижизненно из хвостовой вены [12]. Клеточные элементы гемопоэза (эритроциты) исследованы у 200 половозрелых особей судака и леща, количество проанализированных клеток – 200741.

Для выявления микроядер в эритроцитах периферической крови судака (*S. lucioperca*) и леща (*A. brama*) мазки крови окрашивали азур-эозином по Романовскому (1 капля основного раствора на 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды с рН 6,8-7,0) в течение 20 мин., затем дополнительно окрашивали красителем Giemsa-Solution Microscopy grade (AppliChem, Germany) (2 капли красителя на 1 мл. дистиллированной воды с рН 6,8-7,0) в течение 15 мин [12; 16, 347-348].

На препаратах проводился учет эритроцитов с микроядрами и другими отклонениями от нормальной конфигурации интерфазного ядра. Микроядра определялись в соответствии с критериями, разработанными доктором Мерч (1996) и другими авторами [21, 48].

- Микроядра представляют собой сферические цитоплазматические включения хроматина, имеющие четкий контур.
- Диаметр микроядер варьирует от одной десятой до одной трети диаметра ядра.
- Микроядра похожи на ядра по структуре и окраске.
- Микроядра не связаны с ядром.

Согласно рекомендациям Л.Д. Житеновой с соавторами [3, 14-26] учитывались следующие патоморфологические изменения структуры ядра.

*Кариорексис* – распад ядра на отдельные части различной величины при сохранении ядерной оболочки. Эти фрагменты, округлой формы и резко пикнотичные, не связаны между собой.

*Хроматинолиз* – уменьшение видимого количества хроматина и, в конечном итоге, полное его растворение; ядро окрашивается в светлый цвет, контуры его сохраняются.

*Гиперхроматоз* стенки ядра эритроцитов (ядра-кольца) – конденсация хроматиновых структур.

Изменение формы ядра – существенный диагностический признак: деформация ядер цитоплазматическими включениями при дистрофических процессах, полиморфизм ядер при воспалении (*гранулематоз*) и опухолевом росте (клеточный атипизм).

Долю клеток с микроядрами (МЯ %) определяли отношением количества клеток с микроядрами к общему количеству проанализированных эритроцитов  $p = m / n \%$ .

Долю клеток с другими типами патологии ядра определяли аналогично. Математическая оценка результатов проводилась с помощью метода альтернативного анализа и критерия Стьюдента. Для установления зависимостей между исследуемыми показателями проводился корреляционный анализ.

### Результаты и обсуждение

При анализе мазков крови в эритроцитах рыб были обнаружены как относительно крупные, так и мелкие микроядра (рис. 1). При этом в одной клетке отмечались по 1-2 и более микроядер. В ряде исследований [6, 20; 8, 247-248] показано, что появление клеток с крупными микроядрами связано с нарушением веретена деления, появление клеток с мелкими микроядрами преимущественно связано с образованием аберраций хромосом.

Анализ, проведенный осенью 2006, весной и осенью 2007 и 2008 гг., показал наличие микроядер в эритроцитах периферической крови как судака, так и леща. Частота встречаемости клеток с микроядрами в эритроцитах периферической крови особей судака и леща Волго-Каспийского канала (рис. 2) в любой период исследования достоверно и стабильно превышала уровень, наблюдаемый при спонтанном мутагенезе (фоновый уровень: 0,5-1,0‰) [8, 253].

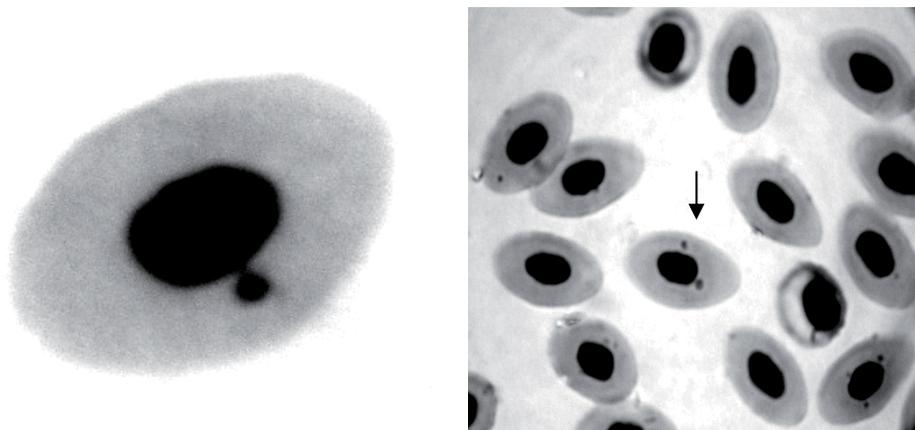
Анализ выявил сезонную изменчивость частоты встречаемости клеток с микроядрами (рис. 2). В летний период исследования

2007 и 2008 гг. доля клеток с микроядрами было достоверно выше, чем в осенний период 2008 г. (при  $p < 0,001$ ).

В эритроцитах леща отмечен более высокий уровень «микроядерности» клеток в весенний период и более низкий – осенью. Сезонные различия частоты встречаемости микроядер могут быть связаны с сезонными изменениями клеточного метаболизма рыб и с разной степенью загрязненности водной среды в весенние и осенние месяцы года. Многолетние гидрохимические и токсикологические исследования, проводимые на Волго-Каспийском канале, подтверждают повышенный уровень загрязнения в весенний период. В сезонном аспекте отмечено возрастание концентрации металлов (Hg, Pb, Zn, Cu и другие) в весенний период. Это связано с выносом загрязняющих веществ в период половодья [9, 130]. В анализируемом материале в большинстве случаев встречались эритроциты с мелкими микроядрами, что может косвенно свидетельствовать о генотоксическом воздействии загрязняющих веществ воды Волго-Каспийского канала, вызывающих, в основном, возникновение структурных аберраций хромосом.

При статистическом анализе полученных результатов была обнаружена обратная корреляционная зависимость частоты встречаемости клеток с микроядрами и вероятности встречаемости клеток с другими признаками цитопатологических нарушений. Величина коэффициента корреляции:  $R \pm m r = - 0,58 \pm 0,17$  при  $p < 0,01$ . Установлено, что вероятность встречаемости клеток с микроядрами возрастает в тех случаях, если снижается доля клеток с другими признаками различной степени деструкции ядра (табл. 1), такими как, хроматинолиз, кариолиз с явлениями близкими фрагментозу, кариорексис (рис. 3).

Учитывая существование достоверной взаимосвязи встречаемости клеток с микроядрами со снижением доли клеток с другими признаками деструкции ядра, можно предполагать, что количество клеток с микроядрами имеет взаимосвязь с процессами, ведущими к другим нарушениям структуры ядра (табл. 1).



ув.  $\times 1000$

Рис. 1. Микроядра в эритроцитах периферической крови судака и леща

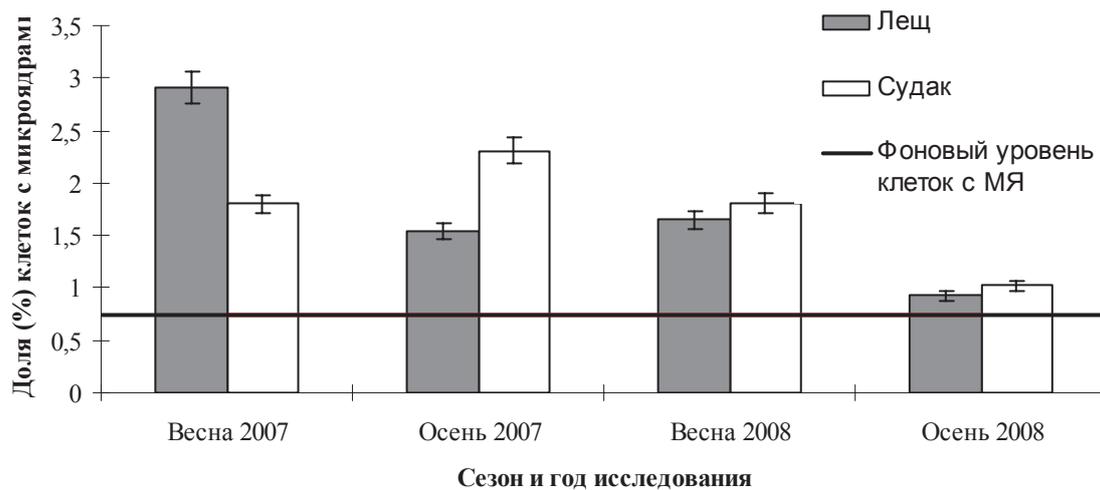


Рис. 2. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в крови особей промысловых видов рыб

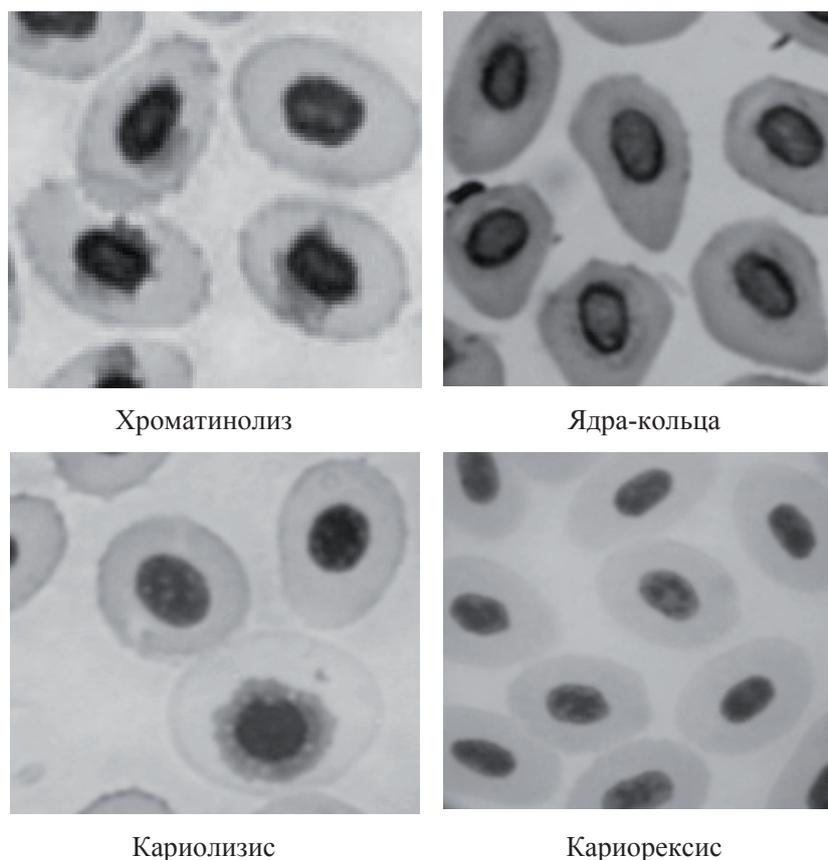


Рис. 3. Деструктивные нарушения ядер эритроцитов

Таблица 1

**Частота встречаемости клеток с микроядрами (МЯ) и другими нарушениями структуры ядра в эритроцитах крови рыб**

Показатели	Доля (%) клеток с нарушениями			
	Лето		Осень	
	М±m,	Интервал варьирования	М±m,	Интервал варьирования
<b>2007 г.</b>				
1. Эритроциты с МЯ	1,8±0,15	0,5-3,2	2,29±0,36	0,6-8,3
2. Эритроциты с другими нарушениями структуры ядра	9,3±4,48	0-100,0	4,7±2,19	0,5-46,5
<b>2008 г.</b>				
1. Эритроциты с МЯ	1,81±0,14	0,7-3,3	1,02±1,04	0,3-2,6
2. Эритроциты с другими нарушениями структуры ядра	26,5±5,57	0,1-100,0	30,7±7,39	0-100,0

Зависимость доли эритроцитов с МЯ и эритроцитов с другими нарушениями структуры ядра может быть выражена графически в виде кривой (рис. 4), соответствующей распределению Пуассона.

Микроядра в ряде случаев могут образовываться в процессе освобождения клетки от «лишнего» хроматина, когда клетка после мутационного воздействия «пытается» восстановить ядерный аппарат [5, 99], т. е. в изменившихся условиях клетка переходит на новый уровень интенсивности своего функционирования и «стремится» сохранить своё стабильно-динамическое состояние. Образование микроядер в таком случае можно рассматривать как результат (и вариант) адаптивных процессов (клеточная адаптация).

Образование микроядер в клетках, их наличие может представлять собой проявление реализации компенсаторно-приспособительных процессов. Формирование клеток с микроядрами может рассматриваться в качестве признака, указывающего на развитие патологических изменений в структуре эритроцитов под действием повреждающих факторов среды и нарушения цитогенетического гомеостаза.

Известно, что если адаптационные возможности недостаточны или, если исполь-

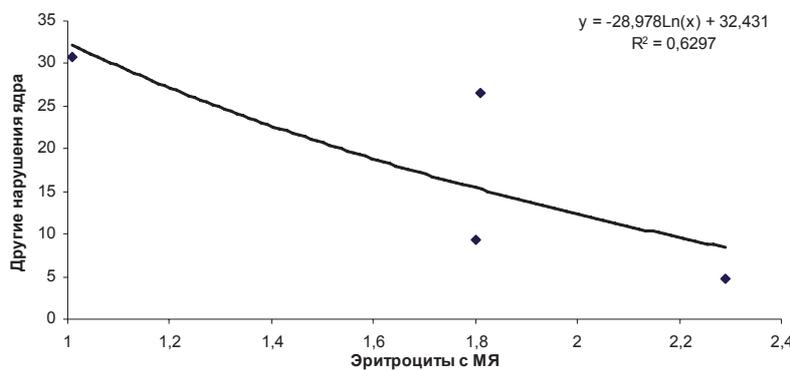


Рис. 4. Зависимость доли эритроцитов с МЯ и эритроцитов с частотой возникновения других нарушений структуры ядра

зуемые для адаптации и защиты программы, вследствие своего несовершенства, сами порождают вторичные нарушения, следует повреждение клетки. Такие нарушения в структуре клетки, как конденсация ядра (кариопикноз) с последующим его растворением (кариолизис) или распадом на конденсированные глыбки (кариорексис), можно рассматривать как начальные стадии повреждения клетки, ведущие к гибели клетки. Данные нарушения возникают в ответ на действия повреждающих, стрессирующих факторов как вне, так и внутри организма.

#### Выводы

Формирование клеток с микроядрами может рассматриваться в качестве показателя развития патологических изменений в структуре эритроцитов под действием повреждающих факторов среды и наруше-

ния цитогенетического гомеостаза.

Изменения цитогенетического гомеостаза связаны с последствиями химического загрязнения вод канала нефтепродуктами. Обнаруженное повышенное количество микроядер в эритроцитах периферической крови судака и леща свидетельствует о потенциальной генотоксичности загрязненных вод Волго-Каспийского канала.

Частота встречаемости клеток с микроядрами в эритроцитах периферической крови особей судака и леща Волго-Каспийского канала превышает уровень, наблюдаемый при спонтанном мутагенезе.

Установлен более высокий уровень «микроядерности» клеток в весенний период и более низкий осенью.

Образование клеток с микроядрами и их количество имеет достоверную взаимосвязь с другими патологическими процес-

сами, ведущими к нарушениям структуры ядра.

Оценка уровня клеток с микроядрами может служить индикатором состояния организма, его адаптационных возможностей, а также уровня возникновения нарушений в клетках вследствие действия повреждающих факторов среды.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Аббасова А.Р., Палатников Г.М. Генотоксическое состояние популяции воблы *Rutilus rutilus caspicus* на юге побережья Апшерона // Материалы первой международной научно-практической конференции молодых ученых «Комплексные исследования биологических ресурсов южных морей и рек». Астрахань, 2004. С. 11-13.
2. Давыдов О.Н. Патология крови рыб. Фирма «ИНКОС», 2006. 206 с.
3. Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов-на-Дону, 1989. 112 с.
4. Журавлева, Г.Ф. Морфофункциональные основы адаптивной модификации осетровых при эндоэкологическом токсикозе // Успехи современного естествознания. 2003. № 3. С. 68.
5. Изюмов Ю.Г., Таликина М.Г., Чеботарева Ю.В. Количество микроядер в эритроцитах периферической крови плотвы *Rutilus rutilus* и леща *Abramis brama* Рыбинского и Горьковского водохранилищ // Биология внутренних вод. 2003. № 1. С. 98-101.
6. Ильин Д.А. Аспекты формирования микроядер (обзор литературы) // Естествознание и гуманитаризм: сб. науч. работ. Томск, 2005. Т. 3. № 4. С. 20-22.
7. Ильинских Н.Н., Козлова С.А., Ильинских И.Н., Ильинских Е.Н., Юркин А.Ю. Морфологические изменения эритроцитов крови людей, проживающих на территориях геохимической провинции с месторождениями кадмия // Современный мир, природа и человек. Сборник научных трудов. Томск, 2009. Т.1. № 2. С.25-30.
8. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. 272 с.
9. Катунин Д.Н., Егоров С.Н. Исследовать гидролого-гидрохимические и эколого-токсикологические условия формирования рыбных запасов в низовьях р. Волги и Каспийском море // Отчет о НИР (годовой): КаспНИРХ. Астрахань, 2009. С.121-135.
10. Кладис Е.Ю., Галкина О.А. Использование аномалий ядер эритроцитов рыб для тестирования экологической ситуации в прибрежной зоне Черного моря // Вопросы рыболовства. 2002. № 1. С. 165-167.
11. Конченко Д.С. Морфология клеток крови при патологических процессах // Вестник Росс-го гос. мед. ун-та им. Н.И. Пирогова. 2010. Спец. вып. № 2. С.501.
12. Методические указания по проведению гематологического обследования рыб / Министерство сельского хозяйства и продовольствия РФ, Департамент ветеринарии № 13-4-2/1487 от 02.02.1999 г.
13. Моисеенко Т.И., Гашкина Т.И., Шарова Ю.Н., Покося А. Г. Экоотоксикологическая оценка последствий загрязнения вод р. Волга. // Водные ресурсы. 2005. № 4. С.410-424.
14. Молдавская А.А., Журавлева Г.Ф., Врочинский К.К., Федорова Н.Н., Теплый Д.Л., Земков Г.В. Морфофункциональные аспекты появления токсикоза у рыб (экспериментальные и натуральные наблюдения). Астрахань, 2003. 182 с.
15. Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитогенетический словарь / Пер. с нем. М.: «Колос» 1967. 607 с.
16. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М. 1957. 468 с.
17. Озернюк Н.Д., Нечаев С.К. Анализ механизмов эволюционных процессов // Изв. РАН. Сер. Биол. 2002. № 4. С.457-462.
18. Шиффман Ф. Дж. Патолофизиология крови / Пер. с англ. М. – СПб.: «Изд-во БИНОМ» - «Невский Диалект», 2001. 448 с.
19. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб: Справочник / Сост. Л.Д. Житенева, О.А. Рудницкая, Т.И. Калюжная. Ростов-на-Дону: Изд-во «Молот», 1997. 152 с.
20. Hoofman R. N., Raat de W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl metanosulphanate // Ibid. -104. 1982. №1. P. 147-153.
21. Mersh J., Beauvais M.N., Nagel P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research*, 371, 1996. P. 47-55.
22. Phan Van Ngan, Vicente Gomes et al. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian

Antarctic Research Station «Comandante Ferraz», King George Island // Polar Biol, 2007. № 30. P. 209-210.

23. Gregoire, M. Interphasic chromosome segregation in micronuclei followed by electron microscopy

and fluorochromes H 33342 binding to DNA / M. Gregoire, D. Hernandez-Verdun, C Masson et al. // Biol. Cell. 1982. № 2. P. 123-129.

УДК 577.23

**Матвеев Н.А.**

*Институт истории естествознания и техники им. С.И. Вавилова РАН*

## **К ВОПРОСУ О РОЛИ ТЕРМОДИНАМИКИ И БИОЭНЕРГЕТИКИ В ИСТОРИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ\***

*N. Matveenko*

*S.I. Vavilov Institute of History of Science and Technology Russian Academy of Sciences*

### **TO THE ROLE OF THERMODYNAMICS AND BIOENERGETICS IN THE HISTORY OF PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY**

*Аннотация.* В статье обсуждается ведущая роль термодинамики в преобразовании биологии в точную науку «по образцу физики и химии». Биоэнергетика, возникнув в 60-х гг. XIX ст. как новое течение общей физиологии, исследующее возможность применимости законов термодинамики к анализу процессов в живых организмах, к 20-м гг. XX ст. приобретает черты самостоятельной биохимической исследовательской области. Её развитие в 1930-х — 1960-х гг. привело к формированию науки биоэнергетики, изучающей молекулярные основы энергетического обмена живых систем. Делается вывод, что история биоэнергетики отражает наиболее существенные закономерности становления современной физико-химической биологии.

*Ключевые слова:* биоэнергетика, энергия, термодинамика, дыхание, фотосинтез, биологическое окисление, брожение, цикл лимонной кислоты (Кребса), дыхательная цепь, окислительное фосфорилирование, аденозинтрифосфат (АТФ), электрохимический потенциал ионов водорода ( $\Delta\mu\text{H}$ ), хемосмотическая теория.

*Abstract.* In the article the leading role of thermodynamics in transformation of biology into the kind of exact science like physics and chemistry is discussed. Bioenergetics emerged in the 1860's as a new branch of general physiology investigating the applicability of thermodynamics laws to living processes, in the 1920's became a research field of biochemistry. In the 1930's — 60's bioenergetics as the science investigating the molecular basis of energy metabolism is formed. The conclusion is made that the history of bioenergetics reflects the most significant patterns of the development of modern physical-chemical biology.

*Key words:* bioenergetics, energy, thermodynamics, respiration, photosynthesis, biological oxidation, fermentation, citric acid (Krebs) cycle, respiratory chain, oxidative phosphorylation, adenosine triphosphate (ATP), proton electrochemical gradient ( $\Delta\mu\text{H}$ ), chemiosmotic theory.

Самостоятельное обеспечение энергоресурсами является одной из фундаментальных особенностей живых систем. Наука, исследующая эту функцию, называется биоэнергетикой и представляет собой один из разделов современной биохимии и молекулярной биологии [9].

\* © Матвеев Н.А.