

0-773579

На правах рукописи

УДК(574.5:615.9)

ПЕНКИН

Михаил Александрович

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ МУТАГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ГИДРОБИОНТОВ**

Специальность 03.00.18 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2008

Работа выполнена на кафедре биоэкологии и ихтиологии Московского государственного университета технологий и управления (МГУТУ).

Научный руководитель:	доктор биологических наук, профессор Симаков Юрий Георгиевич
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, профессор Микодина Екатерина Викторовна доктор биологических наук, профессор Мелихова Ольга Петровна
Ведущая организация:	Всесоюзный научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства

Защита состоится 26 декабря 2008 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 307.004.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) по адресу: 107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, д. 17.

Факс 8-499-264-91-87, электронный адрес sedova@vniro.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИРО.

Автореферат разослан «25» ноября 2008 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000552221

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

М.А.Седова

Общая характеристика работы

Актуальность исследования. Одной из актуальных и вместе с тем наименее разработанных проблем гидробиологии является нарушение структуры полигенных и митотических хромосом у гидробионтов (в том числе у ценных в хозяйственном отношении видов) и регуляции митотической активности в условиях воздействия антропогенных факторов, таких как мутагенные вещества и проникающая радиация. Возникающие при этом мутации могут привести к увеличению наследуемых генетических патологий и резко снизить продуктивность рыбохозяйственных водоемов. Возникает и вторая проблема - возникновение уродств и злокачественных опухолей у гидробионтов вследствие появления у них хромосомных aberrаций, ухудшающих качество товарной продукции.

В настоящее время число веществ, обладающих генотоксичными свойствами, увеличивается каждый день примерно на тысячу соединений. Понятно, что большая часть вновь синтезируемых соединений не относится к мутагенам и не попадает в водную среду, однако промышленные сточные воды несут в водоемы значительную часть соединений с мутагенными и канцерогенными свойствами.

Актуальность работы возрастает в связи с возможными аварийными ситуациями на АЭС, при которых проникающая радиация может оказать существенные изменения в генетическом аппарате. Однако до настоящего времени на многие вопросы, связанные с оценкой воздействия радиации на водные организмы на цитогенетическом уровне не получен надлежащий ответ. Недостаточно сведений о том, каким образом действуют токсиканты и радиация на структуру хромосом и регуляцию митотической активности у рыб (Pisces) и амфибий (Amphibia), а также о результатах действия указанных факторов на структуру полигенных хромосом хирономид и митотических хромосом у рыб и амфибий.

Под влиянием интенсивного рентгеновского излучения у гидробионтов, с высоко дифференцированным хрусталиком глаза, в частности у амфибий и рыб, могут развиваться катаракты. В патогенезе катаракт, возникающих под воздействием факторов различной природы, отмечается много общего и предстоит ответить, чем вызван сходный ответ на различные типы экзогенного воздействия.

Цель работы. Цель работы – обосновать применение морфологических перестроек в хромосомах гидробионтов под влиянием мутагенных факторов для оценки воздействия генотоксичных веществ и проникающей радиации.

Для достижения цели работы решались следующие задачи:

1. Выявить типы перестроек полигенных хромосом хирономид при воздействии мутагенных токсикантов.
2. Выявить особенности хромосомных aberrаций и нарушения дифференциальной активности генов в полигенных хромосомах при воздействии генотоксичных загрязнителей водоемов.

3. Исследовать действие веществ, вызывающих aberrации в хромосомах клеток различных зон цитодифференцировки хрусталика рыб, на их митотическую активность.

4. Изучить изменение клеточной пролиферативной активности (по митотическому индексу) и размеров зон дифференцировки по оптической плотности в эпителии хрусталика рыб при воздействии токсикантов.

5. Выявить воздействие рентгеновского излучения на митотическую активность в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика рыб и амфибий.

6. Исследовать воздействие травматизации, рентгеновского излучения и токсикантов на пространственное распределение митозов в эпителии хрусталика глаза рыб и амфибий.

Научная новизна. Впервые показано, что хромосомные aberrации в политенных и митотических хромосомах у ряда гидробионтов при воздействии генотоксичных веществ и рентгеновского излучения имеют однотипный характер и сходные морфологические перестройки.

Впервые показано, что хромосомные aberrации в политенных хромосомах личинок хирономид, полученные в результате воздействия вредных антропогенных факторов, сопровождаются структурной перестройкой хромосом и происходит нарушение конъюгации политенных хромосом, что дает возможность оценить степень мутагенного эффекта.

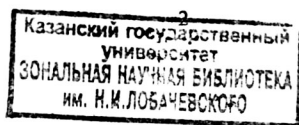
Впервые показано, что под влиянием мутагенных веществ в эпителии хрусталика рыб меняются размерные параметры зон цитодифференцировки.

Установлено, что токсиканты и рентгеновское облучение в регенерирующем после травмы эпителии хрусталика нарушают пространственное распределение посттравматических митозов и вызывают их ассиметричное распределение относительно малодифференцированной центральной зоны.

Практическая значимость. Исследование действия генотоксичных водных загрязнителей, травматизации и рентгеновского излучения на хромосомный аппарат ряда гидробионтов позволяет создать новые биотесты для выявления мутагенных факторов в водной среде.

Использование политенных хромосом хирономид для выявления мутагенных физических и химических факторов позволяет применять их как экспрессные биоиндикаторы, когда в течение суток может быть получен ответ о появлении нарушений в дифференциальной активности генов по пуфингу и изменений на хромосомном уровне. Разработанные цитогенетические методы могут быть основой для оценки воздействия мутагенных факторов на политенные хромосомы.

Свойство токсикантов и рентгеновских лучей нарушать пространственное распределение посттравматических митозов в эпителии хрусталика может служить биомаркером для выявления начальных стадий катаракты у рыб, которая часто наблюдается у лососевых в аквакультуре, а также у других видов рыб при загрязнении природных водоемов токсикантами.



Полученные данные используются в учебном процессе в ВУЗах при чтении лекций и проведении лабораторных работ по таким предметам как Генетика, Водная токсикология, Санитарная гидробиология.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации представлены на международном симпозиуме по иммунологии и патологии рыб ИБВВ РАН (Борок, 2007), на Международном симпозиуме «Молекулярные, клеточные и эволюционные аспекты морфогенеза» ИБР РАН (Москва, 2007), на научных семинарах кафедры биоэкологии и ихтиологии МГУ ТУ (Москва, 2005 – 2007).

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 142 страницах и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы (190 источников), в том числе 62 источников на иностранных языках.

Основное положение, выносимое на защиту.

- Структурные изменения полигенных и митотических хромосом, регуляция митотической активности и цитодифференцировки у гидробионтов являются системным показателем при оценке комплексного влияния генотоксических факторов.

Глава 1. Обзор литературы

В главе представлен анализ действия токсикантов, обладающих мутагенным свойством, и рентгеновского облучения на полигенные хромосомы хирономид и митотические хромосомы эпителия хрусталика рыб (радужная форель *Oncorhynchus mykiss*) и амфибий (травяная лягушка *Rana temporaria*). Приведены данные об основных цитогенетических изменениях под влиянием мутагенных факторов и дана сравнительная характеристика действия рентгеновского излучения и мутагенных загрязнителей водной среды на митотические и интерфазные хромосомы у различных видов гидробионтов.

Глава 2. Материал и методы исследования

Материал для работы собран в лабораторных условиях. У рыб объектом исследований служил хрусталик глаза сеголеток и годовиков радужной форели. Рыб содержали по 10 шт. в 20-литровых аквариумах с дополнительной аэрацией. Кормление рыб осуществляли мотылем. Температура воды составляла $18 \pm 2^\circ \text{C}$. Помимо этого, для опытов также использовали половозрелую травяную лягушку в возрасте 3 лет. Лягушек (по 5 шт.) содержали в лабораторных условиях в 5-литровых емкостях, над дном которых был небольшой слой воды.

Использовали общепринятые методы исследования полигенных хромосом в слюнных железах личинок хирономид и получения тотальных препаратов эпителия хрусталика глаза сеголеток и годовиков радужной форели и травяной лягушки. Примененные для исследования методы широко используются в цитогенетических исследованиях для оценки генотоксичности химических веществ и проникающей радиации (Веетман, 1961; Рапопорт, Дроздовская и др., 1971; Кикнадзе, 1972, 1975; Пашин, Козаченко, 1983;

Lehman, 1984; Айла, Кайгер, 1987; Симаков, Никифоров-Никишин, Кузнецова, 1990; Симаков, 1998, 2002).

Мы выявляли морфологические изменения политенных хромосом (хромосомные аберрации и пуфинг) под влиянием мутагенных веществ после их окрашивания ацет-орсеином в наиболее активный период их перестроек на 36 и 38 стадиях развития (Кикнадзе, 1975) и оценивали на цитогенетических препаратах степень морфологических изменений хромосом. При исследовании митотических хромосом в эпителии хрусталика радужной форели и травяной лягушки основное внимание обращали на нарушение хромосомного аппарата в процессе митоза на стадии ана-телофазы, на изменение митотического индекса и на пространственное распределение митозов после воздействия химических и лучевых мутагенных факторов.

В качестве мутагенных веществ для проведения экспериментальных исследований использованы три соединения: 2-нафтол, эпихлоргидрин и бихромат калия. Обоснованием их выбора мутагенных загрязнителей водоемов послужило следующее:

2-нафтол – бензольное соединение с установленными ранее генотоксичными свойствами, попадает в рыбохозяйственные водоемы с промышленными стоками (анилиноокрасочная промышленность). Для хронических экспериментов нами были взяты концентрации: 0,2; 0,1; 0,01; 0,001 мг/л, с тем учетом, что в этот интервал попадает рыбохозяйственный норматив ПДК (0,01 мг/л).

Эпихлоргидрин – Эпихлоргидрин используется в производстве эпоксидных смол, эпихлоргидриновых каучуков, ионообменных смол и других полимерных материалов. Это — алкилирующий агент и мутаген для бактерий, грибов, сосудистых растений, насекомых и млекопитающих в культуре в отсутствии экзогенной метаболической активации. Он также попадает в рыбохозяйственные водоемы с промышленными стоками. Спектр исследуемых концентраций варьировал от 0,005 до 1,0 мг/л. с тем учетом, что в этот интервал попадает рыбохозяйственный норматив ПДК (0,01 мг/л).

Бихромат калия. Для экспериментальных исследований нами использовался бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) ЧДА. Бихромат калия часто используется как стандартный токсикант, который вызывает у гидробионтов генные мутации и хромосомные аберрации. Это соединение также попадает в рыбохозяйственные водоемы с промышленными стоками. Для исследований использованы концентрации от 0,001 до 0,2 мг/л с тем учетом, что в этот интервал попадает рыбохозяйственный норматив ПДК (0,02 мг/л).

Действие рентгеновских лучей изучали на эпителии хрусталика глаза годовиков радужной форели и травяной лягушки. Рыб облучали на линейном ускорителе 6 МэВ тормозного излучения, фирмы Philips с дозами 50, 500 и 5000 Р. Для фиксации рыб во время облучения их помещали в мелкую ванночку с перегородками. Глаза рыб изымали и фиксировали в смеси Карнуа (Лилли, 1969) на 1, 8, 16 и 21 сутки после облучения. Затем готовили тотальные препараты эпителия хрусталика (Howard, 1952; Симаков, 1998).

Травяные лягушки (30 экз.) получили дозу 10 000 Р. Затем, в облученный хрусталик через двое суток наносили травму иглой в передний полюс на расстоянии 1/5 диаметра хрусталика глаза. Таким образом, хрусталик глаза был под воздействием двух факторов: рентгеновского облучения и травматизации. Глаза лягушек фиксировали в смеси Карнуа (Лили, 1969), а затем готовили тотальные препараты эпителия хрусталика по стандартным методикам и подсчитывали количество митозов в различных зонах его дифференцировки.

Пространственное распределение митозов и митотического индекса в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика после окрашивания гемалауном Майера определяли митотический индекс в полосе, составленной окулярной сеточкой, от периферии к центру при увеличении 15×40.

Статистическая обработка проведена с помощью программы Excel, сравнение результатов - по критерию Стьюдента. Характеристика экспериментального материала представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Виды, эксперименты и объем материала

Виды	Показатели	Число объектов и препаратов
<i>Chironomus plumosus</i>	Структурные изменения в политенных хромосомах	420 препаратов политенных хромосом
<i>Chironomus thummi</i>	Аберрации политенных хромосом	420 препаратов политенных хромосом
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Хромосомные аберрации, размеры зон цитодифференцировки, пространственное распределение митотического индекса при действии радиации и мутагенных веществ	265 рыб, 492 препаратов
<i>Rana temporaria</i>	Пространственное распределение митозов до и после травмы и рентгеновского облучения	70 препаратов

Глава 3. Результаты исследований

3.1. Анализ структуры хромосом гидробионтов после воздействия эпихлоргидрина

После воздействия эпихлоргидрином в течение 30 сут. в эпителии хрусталика глаза радужной форели возникает три типа хромосомных аберраций и изменяется митотический индекс (табл. 3.1).

Таблица 3.1.

Хромосомные aberrации в эпителии хрусталика глаза годовиков радужной форели после воздействия эпихлоргидрина

Концент- рация, мг/л	Хромосом- ные aberrации	Типы хромосомных aberrаций			Митотический индекс
		мосты	фраг- менты	отста- вания	
1,0	15	2	7*	6*	3,28*
0,5	9	-	3	6	3,62*
0,1	4	1	1	2	2,51
0,05	4		1	3	2,42
0,005	5	-	2	3	2,50
Контроль	4	1	2	1	2,45

*Различия достоверны при $p \leq 0,05$

Результаты хронических исследований показывают, что при концентрациях 1,0 и 0,5 мг/л в эпителии хрусталика наблюдаются достоверное повышение количества aberrантных митозов и увеличение митотического индекса, что говорит о цитотоксическом действии эпихлоргидрина. При концентрации 0,1 мг/л статистически достоверных отклонений по сравнению с контролем не происходит. Не отмечено также достоверных отклонений по сравнению с контролем при концентрации 0,05 и 0,005 мг/л. На этом основании концентрацию эпихлоргидрина, равную 0,1 мг/л, можно считать максимально допустимой.

Воздействие эпихлоргидрина на личинок *Ch. plumosus* и *Ch. thummi* в концентрации 0,005 мг/л показало, что у обоих видов политенные хромосомы видны четко, нарушения в них минимальны, структура пufов у этих видов близка к норме.

В концентрации эпихлоргидрина 0,05 мг/л структура политенных хромосом у *Ch. plumosus* и *Ch. thummi* также близка к норме, деструкции концов хромосом не отмечено. Пуфы во всех хромосомах нормальные, отличий от контроля нет.

При концентрации эпихлоргидрина 0,1 мг/л у личинок *Ch. plumosus* на каждой хромосоме виден пуфинг, по краям каждого пуфа наблюдается перетяжка хромосомы. Это одна из типичных деструктивных перестроек политенных хромосом. Изменение хромосом в указанной концентрации эпихлоргидрина наблюдается также у личинок *Ch. thummi*, они становились более деспирализованными, чем у *Ch. plumosus*. Таким образом, в концентрации 0,1 мг/л эпихлоргидрин оказывает генотоксическое влияние на структуру хромосом у *Ch. plumosus* и *Ch. thummi*, выразившееся в появлении пуфов в отдельных участках хромосом, что более сильно выражено у *Ch. thummi*.

При действии концентраций 0,5 и 1,0 мг/л у личинок *Ch. plumosus* отмечены значительные изменения в структуре политенных хромосом слюнных желез. На первой хромосоме видны увеличенные расстояния между дисками и междисками, на второй - деструктированы концы. У личинок *Ch. thummi* в этих

же концентрациях эпихлоргидрина деспирализация поличенных хромосом выражена сильнее.

Сравнительный анализ воздействия различных концентраций эпихлоргидрина показывает, что изменения в структуре хромосом слюнных желез у личинок, исследованных нами видов хирономид, протекают по-разному. Наибольшей деструкции подвергаются хромосомы у *Ch. thummi*, что свидетельствует о большей чувствительности этого вида к данному токсиканту.

3.2. Действие 2-нафтола на поличенные и митотические хромосомы

Для выявления генотоксичности 2-нафтола на хромосомном уровне сеголеток радужной форели содержали в растворах 2-нафтола в течение месяца. Как и в случае с эпихлоргидрином это был хронический эксперимент. Данные о типах и количестве хромосомных aberrаций и митотического индекса в эпителии хрусталика глаза радужной форели в течение 30 сут. представлены в табл. 3.2.

Таблица 3.2.

Хромосомные aberrации и митотический индекс в эпителии хрусталика глаза годовиков радужной форели после хронической экспозиции в растворах 2-нафтола

Концентрация, мг/л	Хромосом- ные aberrации	Типы хромосомных aberrаций			Митотичес- кий индекс
		мосты	фрагменты	отставания	
0,2	10*	2	2	6*	0,76*
0,1	6	1	2	3	1,80*
0,01	4	1	1	2	2,48
0,001	3	1	1	1	2,50
Контроль	4	1	2	1	2,45

* различия достоверны при $p \leq 0,05$

Установлено, что при концентрации 2-нафтола, равной 0,2 мг/л в эпителии хрусталика достоверно повышается число aberrантных митозов и уменьшается митотический индекс, что указывает на его цитотоксическое действие в хроническом эксперименте и второго из исследованных нами токсикантов. При концентрации 2-нафтола, равной 0,1 мг/л, число хромосомных aberrаций достоверно не отличается от контроля, однако митотический индекс существенно ниже (митотический индекс=1,8 в опыте, в контроле митотический индекс=2,45). Можно заключить, что при данной концентрации 2-нафтола генотоксичный эффект снижен. По действию на генетический аппарат рыб концентрацию 0,1 мг/л следует считать максимально допустимой, но в цитологическом плане она не может считаться допустимой. При более низких концентрациях, начиная от 0,01 мг/л и ниже, 2-нафтол не проявляет генотоксических свойств и не нарушает механизма клеточного деления.

Воздействие 2-нафтола на личинок *Ch. plumosus* и *Ch. thummi* в концентрации 0,001 мг/л и 0,01 мг/л показало, что у обоих видов поличенные

хромосомы не несут морфологических отклонений, а структура пуфов у этих видов близка к контролю.

При увеличении концентрации 2-нафтола на порядок (0,1 мг/л) у личинок *Ch. plumosus* в каждой хромосоме деструктурированы концы. Первая хромосома сократилась до размеров второй, все пуфы ярко окрашены, что свидетельствует об изменении структуры политенных хромосом. У личинок *Ch. thummi* при этой же концентрации 2-нафтола наблюдается деспирализация хромосом. Таким образом, 2-нафтол в концентрации 0,1 мг/л изменяет структуру хромосом у личинок обоих исследованных видов хирономид.

В концентрации 2-нафтола 0,2 мг/л у *Ch. plumosus* также отмечены изменения в структуре хромосом. В I-й хромосоме увеличиваются расстояния между дисками и междисками, во II-й - выявляется деструкция концов. У *Ch. thummi* в этой же концентрации 2-нафтола деструкция в хромосомах выражены сильнее, чем у *Ch. plumosus*. Видны многочисленные перетяжки, многие хромосомы деспирализованы.

Сравнивая действие 2-нафтола в концентрациях от 0,001 до 0,2 мг/л на структуру хромосом у личинок двух исследованных видов хирономид, следует отметить следующие важные моменты. Во-первых, степень изменений в структуре хромосом слонных желез у личинок этих видов хирономид, различается. Наибольшей деструкции подвергаются хромосомы у *Ch. thummi*. Во-вторых, лишь начиная с концентрации 0,001 мг/л токсическое действие 2-нафтола на структуру хромосом у *Ch. plumosus* и *Ch. thummi* не проявляется.

3.3. Цитогенетические перестройки хромосом под влиянием бихромата калия

Данные о хромосомных aberrациях в эпителии хрусталика глаза радужной форели после хронического воздействия (30 сут.) бихромата калия представлены в табл. 3.3.

Таблица 3.3

Хромосомные aberrации в эпителии хрусталика глаза годовиков радужной форели после экспозиции в растворах бихромата калия

Концентрация, мг/л	Хромосом- ные aberrации	Типы хромосомных aberrаций			Митоти- ческий индекс
		мосты	фрагменты	Отставания хромосом	
2,0	10	2	5	3	0,86*
1,0	8	2	5	1	1,10*
0,1	4	1	2	1	2,52
0,01	5	0	2	3	2,41
0,001	4	-	2	2	2,55
Контроль	4	1	2	1	2,45

*различия достоверны при $p \leq 0,05$

При воздействии раствора шестивалентного хрома концентрацией 2,0 мг/л в эпителии хрусталика глаза выявлено достоверное повышение числа aberrантных митозов в 2,5 раза и снижение митотического индекса в 2,8 раз, что говорит о цитотоксическом действии бихромата калия в указанной

концентрации. При концентрации 1,0 мг/л число хромосомных aberrаций в 2 раза выше, чем в контроле, а митотический индекс более чем в 2 раза ниже.

Только при концентрациях бихромата калия, равных 0,1, 0,01 и 0,001 мг/л, не отмечено цитогенетических отклонений по сравнению с контролем, в связи с чем концентрацию этого вещества в 0,1 мг/л можно считать максимально допустимой.

Оценка структуры поличенных хромосом при воздействии бихромата калия на личинок *Ch. plumosus* и *Ch. thummi* показала, что при концентрации 0,001 мг/л у обоих видов они не несут видимых отклонений.

В концентрации бихромата калия 0,01 мг/л структура поличенных хромосом у *Ch. plumosus* близка к норме, однако у личинок *Ch. thummi* была обнаружена их незначительная деструкция, хотя все хромосомы хорошо идентифицировались. Несмотря на некоторые нарушения в структуре хромосом, по-нашему мнению, шестивалентный хром в концентрации 0,01 мг/л не проявил значимого токсического действия на структуру поличенных хромосом у исследованных видов хирономид.

Впервые нарушения структуры поличенных хромосом обнаружили в растворе бихромата концентрацией 0,1 мг/л. У личинок *Ch. plumosus* стали видны пuffy и перетяжки, у *Ch. thummi* - деспирализация и деструкция хромосом. Таким образом, в концентрации 0,1 мг/л бихромат оказывал влияние на структуру хромосом у исследованных видов *Ch. plumosus* и *Ch. thummi*.

При концентрации бихромата калия 1,0 мг/л в поличенных хромосомах у *Ch. plumosus* изменения в структуре поличенных хромосом усиливаются. На I и III хромосомах увеличивается расстояние между дисками и междисками, II хромосома имеет "расплавленный" конец. При этом у *Ch. thummi* при этой концентрации бихромата калия явления деструкции в хромосомах выражены сильнее, чем у *Ch. plumosus*.

В концентрации бихромата калия 2,0 мг/л у личинок *Ch. plumosus* отмечены значительные изменения в структуре хромосом. На I хромосоме значительно увеличивается расстояние между дисками и наблюдается образование перетяжек. У другого исследованного вида *Ch. thummi* нарушения в структуре хромосом в растворе этой концентрации сходны с *Ch. plumosus*. Четко видны большие промежутки между дисками и междисками на I и II хромосомах, отмечены пuffy с перетяжками около них.

Таким образом, сравнивая действие бихромата калия в концентрациях от 0,001 до 2,0 мг/л на структуру хромосом у *Ch. plumosus* и *Ch. thummi*, следует отметить, что изменения в структуре хромосом слюнных желез под воздействием бихромата калия более выражены у личинок *Ch. thummi*.

3.4. Размеры зон цитодифференцировки в эпителии хрусталика глаза радужной форели после воздействия мутагенными веществами

Методические особенности. Данный раздел работы помещен именно в результатах, т.к. определенные тонкости этой части работы решали в процессе ее выполнения. Для изучения зон дифференцировки эпителиальных клеток хрусталика мы применили фотографирование цифровой камерой отдельных

фрагментов эпителия, в виде полосы от центральной части до периферии. Дальнейшее исследование проводили с помощью специально разработанной программы ИС для обработки полученного материала на компьютере. Полосу эпителия делили на равные квадраты и измеряли относительную оптическую плотность клеток эпителия в разных зонах. Распределение клеток в различных зонах цитодифференцировки оценивали у сеголеток радужной форели с одинаковыми размерами эпителия хрусталика глаза (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Зоны цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза радужной форели от центра (слева) к периферии (справа).

Для выяснения степени окрашивания ядер использовали денсиметрию, позволяющую косвенно говорить об образовании гетерохроматина в дифференцирующихся клетках предэкваториальной зоны эпителия хрусталика. Клетки с наиболее окрашенными ядрами, указывающими на завершение цитодифференцировки, могут быть отнесены к дифференцированной зоне. Клетки эпителия хрусталика с высоким содержанием эухроматина отнесены нами к центральной зоне. Промежуточная зона с наибольшей градацией эу- и гетерохроматина представляет собой герминативную зону.

Результаты исследований. Изучение эпителия хрусталика рыб с отклонениями, возникшими в результате воздействия веществ, обладающих генотоксичными свойствами, за 21 сутки опыта позволяет установить влияние вредных факторов на величину его зон цитодифференцировки эпителия.

Исследование клеток эпителия сеголеток радужной форели показывает, что наименьшая плотность окраски ядер отмечена в центральной части эпителия. Герминативная зона со средней плотностью ядер в эпителии у большинства рыб характеризуется примерно одинаковой оптической плотностью. При этом выявляется градация цитодифференцировки клеток и постепенный переход в предэкваториальную зону, где находятся наиболее дифференцированные клетки (рис. 3.4.1).

При действии эпихлоргидрина и 2-нафтола в концентрациях, взятых ранее при исследовании хромосомных aberrаций, в герминативной зоне эпителия хрусталика, отмечается сокращение размеров герминативной зоны по сравнению с контролем до 20–25 %.

Сравнительный анализ цитодифференцировки эпителия хрусталика у исследуемых рыб показывает, что нарушение дифференцировки клеток и сокращение размеров герминативной зоны у рыб, находящихся в действующих концентрациях эпихлоргидрина и 2-нафтола, сходны между собой. Это позволяет идентифицировать клетки эпителия хрусталика и, опираясь на размеры ядер и состояние кариоплазмы судить о размерах зоны цитодифференцировки и их изменении при действии генотоксичных факторов.

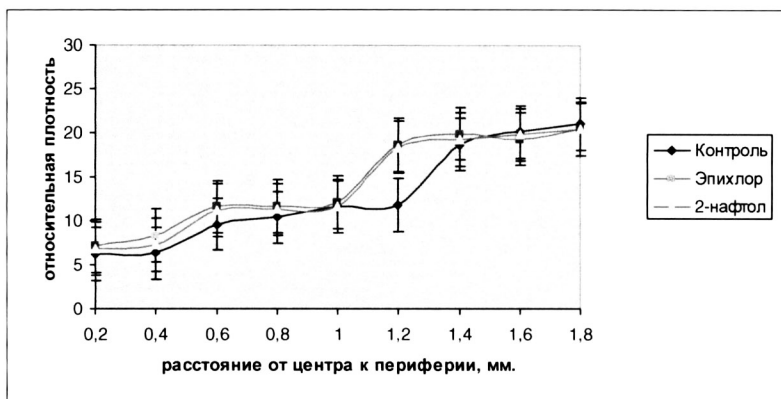


Рис. 3.4.1 Оптическая плотность ядер эпителия хрусталика глаза радужной фореи в различных зонах цитодифференцировки в контроле и при действии эпихлоргидрина (0,5 мг/л) и 2-нафтола (0,1 мг/л).

Установленное сокращение герминативной зоны эпителия хрусталика сеголеток радужной фореи под воздействием исследованных веществ позволяет проводить сравнительный анализ других поллютантов и судить по этому показателю об их гено- или цитотоксичности.

3.5. Ингибиторы клеточной пролиферации в хрусталиках глаза рыб и амфибий

3.5.1. Влияние 2-нафтола на темп клеточной пролиферации в эпителии хрусталика глаза радужной фореи

Влияние 2-нафтола на темп клеточного деления оценивали по митотической активности в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза в хроническом опыте (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Митотический индекс в клетках эпителия хрусталика глаза радужной фореи через 21 сут. после воздействия различных концентраций 2-нафтола

Концентрация 2-нафтола, мг/л	Митотический индекс в различных зонах цитодифференцировки эпителия		
	предэкваториальная	герминативная	центральной
0.1	1,15±0,12	3,24±0,18	0,64±0,06
0.2	0	2,30±0,21	0
0.4	0,58±0,06	3,52±0,35	0,57±0,07
0.6	1,07±0,10	6,33±0,40	0,62±0,08
0.8	1,78±0,15	8,17±0,66	0,76±0,05
Контроль	1,82±0,17	7,75±0,36	0,91±0,08

Жирным шрифтом выделены результаты, достоверно различающиеся по критерию Стьюдента ($p \leq 0.01$).

Бензольное соединение с генотоксичными свойствами - 2-нафтол, оказывает влияние на величину митотической активности эпителия хрусталика двояко. Низкие концентрации оказывают ингибирующее действие. Особенно резко уменьшается митотический индекс при концентрации 0,2 мг/л в дифференцированных зонах эпителия. В промежутке от 0,1 до 0,4 мг/л митотический индекс остается на самом низком уровне, а дальнейшее увеличение концентрации 2-нафтола, наоборот, приводит к повышению этого показателя до величин, близких к контролю.

При действии 2-нафтола в зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика сегментов радужной оболочки наибольшие изменения митотического индекса наблюдали при концентрации 0,2 мг/л.

По пространственному распределению митотического индекса в эпителии хрусталика глаза сегментов радужной оболочки наибольший в центральной зоне цитодифференцировки (табл. 3.5.1).

Таблица 3.5.1

Влияние 2-нафтола в концентрации 0,2 мг/л на величину митотического индекса в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза радужной оболочки от периферии (0) до центра (1,6)

Показатель	Расстояние от периферии до центра, мм										
		0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
Митотический индекс	Контроль	0	0	1,9	1,8	7,3	7,2	1,6	1,4	1,5	1,2
	Опыт	0	0	0	0,8	2,1	2	0,6	0,3	0	0

3.5.2. Действие рентгеновского излучения на клеточную пролиферацию в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза

Воздействие рентгеновского излучения на митотическую активность в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика сегментов радужной оболочки оценено по его влиянию на отдельные участки эпителия хрусталика. Установлено, что экспозиционная доза, равная 500 Р, оказывает активное воздействие на клеточную пролиферацию у сегментов радужной оболочки. Результаты, полученные на 21 сутки после облучения, глаз сегментов радужной оболочки, представлены в табл. 3.5.2.

Таблица 3.5.2

Распределение митозов в различных зонах цитодифференцировки хрусталика глаза сегментов радужной оболочки на 21 сут. после рентгеновского облучения

Показатель	Расстояние от периферии зоны до центра, мм										
Митотический индекс		0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
	Контроль	0	0	1,9	1,8	7,3	7,2	1,2	1,4	1,5	1,2
	Опыт	0	0	0	0,38	2,3	2,3	0,25	0,16	0	0

Рассматривая действие активной дозы лучей Рентгена на митотическую активность в клетках различных зон цитодифференцировки эпителия хрусталика, можно заключить, что оно сходно с воздействием токсикантов, влияющих на митотическую активность в эпителии хрусталика.

3.5.3. Связь между хромосомными aberrациями и митотической активностью при действии различных концентраций эпихлоргидрина

Изучали влияние эпихлоргидрина как на митотическую активность в различных зонах эпителия хрусталика глаза, так и появление при этом aberrативных митозов в зависимости от зон дифференцировки его клеток. Данные о количестве хромосомных aberrаций и митотического индекса в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза сеголеток радужной форели в этом варианте приведены в табл. 3.5.3.

Таблица 3.5.3

Митотический индекс и число хромосомных aberrаций в эпителии хрусталика глаза радужной форели при действии различных концентраций эпихлоргидрина на 21 сутки опыта

Кон- цент- рация, мг/л	Митотический индекс и число хромосомных aberrаций в клетках различных зонах цитодифференцировки эпителия							
	предэкваториальная		герминативная		центральная		сред- ние Хромо- сом- ные aberra- ции	сред- ний мито- тиче- ский ин- декс
	Митоти- ческий индекс	Хромо- сом- ные aberra- ции	Митоти- ческий индекс	Хромо- сом- ные aberra- ции	Митоти- ческий индекс	Хромо- сом- ные aberra- ции		
0,1	1,7±0,16	1,8±0,19	7,8±0,57	2,5±0,18	0,9±0,08	0,8±0,3	1,73	3,50
0,2	5,1±0,43	5,2±0,41	10,3±0,40	8,3±0,25	4,5±0,38	3,7±0,31	5,70	6,60
0,5	0,4±0,04	3,2±0,27	3,5±0,32	5,1±0,40	0,2±0,02	2,1±0,01	3,46	1,40
1,0	2,2±0,12	4,3±0,40	8,4±0,47	6,5±0,69	1,4±0,03	3,2±0,02	4,6	4,0
2,0	0,9±0,35	2,4±0,20	1,1±0,70	4,2±0,35	0,4±0,01	1,4±0,01	2,69	0,86
Конт- роль	1,8±0,17	1,7±0,10	7,7±0,36	2,4±0,30	0,9±0,10	0,7±0,20	1,61	3,45

Жирным шрифтом выделены достоверные различия по критерию Стьюдента при $p \leq 0.01$.

Как показывают результаты, наиболее сильные колебания митотического индекса отмечаются в герминативной зоне, а в предэкваториальной и центральной - в меньшей степени. Сходно с изменением митотического индекса увеличивается или уменьшается количество aberrантных митозов в каждой из зон дифференцировки при различных концентрациях токсиканта. Вариации среднего митотического индекса и среднего количества хромосомных aberrаций показывают (рис. 3.5.4), что в зависимости от концентрации эпихлоргидрина меняется митотический индекс и количество хромосомных aberrаций. Кривые отражают нелинейный затухающий процесс по мере увеличения концентрации токсиканта, причем при более низких концентрациях фазность действия препарата проявляется более четко. При увеличении концентрации эпихлоргидрина исследованные показатели снижаются.

Результаты позволили выявить фазность действия различных концентраций эпихлоргидрина. Установленная связь позволяет при проведении экспериментов с генотоксичными веществами, а возможно и со всеми токсикантами, рекомендовать наиболее внимательно относиться к низким

концентрациям исследуемых веществ, т.к. при небольшом понижении концентраций они могут оказывать противоположное действие и изменить ингибирующий эффект на стимулирующий.

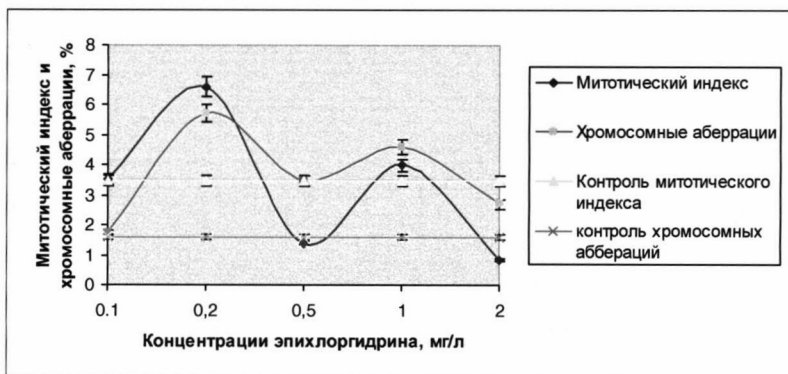


Рис. 3.5.4 Динамика средних значений митотического индекса и хромосомных aberrаций в эпителии хрусталика глаза сеголеток радужной форели на 21 сутки опыта в зависимости от концентрации эпихлоргидрина в воде.

3.6. Пространственное распределение посттравматических митозов в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза рыб и амфибий в норме и при воздействии радиации

3.6.1. Пространственное распределение митозов при регенерации эпителия хрусталика глаза радужной форели

Проведено исследование распределения митозов в эпителии хрусталика глаза сеголеток радужной форели после экспериментального травмирования переднего полюса глаза. Установлено, что через двое сут. после травмы глаза количество посттравматических митозов максимально. В результате проведения работы удалось установить, что распределение митозов в эпителии хрусталика глаза зависит от местоположения травмы в зонах цитодифференцировки. При нанесении укола в передний полюс митозы распределяются в виде полосы в герминативной зоне, в отдалении от места разрыва капсулы и эпителия, и образуют окружность. Асимметричное нанесение укола в центральную зону приводит к тому, что с началом регенерации посттравматические митозы возникают не только в герминативной, но и в дифференцированной предэкваториальной зоне. В этом случае полоса митозов представляет собой эллипс. При этом митозы возникают в зоне дифференциации с противоположной стороны от травмы и тем дальше, чем асимметричнее от центра нанесен укол. И, наконец, третий вариант – при травмировании дифференцирующейся зоны митозы возникают вокруг травмы во всех тканях, кроме эпителия хрусталика глаза.

Анализ полученных результатов показывает, что при регенерации эпителия хрусталика глаза происходит своеобразная пространственная регуляция клеточной пролиферации. Митозы не возникают в

малодифференцированной центральной зоне даже после нанесения травмы, зато они появляются в отдалении от травмы в герминативной зоне, где и в интактных хрусталиках отмечается наиболее высокий митотический индекс. Травма, нанесенная в центральную зону асимметрично, отодвигает полосу митозов в противоположную сторону от места травмы. При этом митозы возникают в дифференцированной зоне, где клетки эпителия начинают превращаться в хрусталиковые волокна, и обычно редко делятся.

3.6.2. Воздействие различных доз радиации на митотическую активность в эпителии хрусталика глаза рыб

В контрольных препаратах эпителия хрусталика глаза годовиков радужной форели митотический индекс в наиболее активной герминативной зоне равен 7,12. В течение хронического опыта (21 сут.), изменений митотического индекса у контрольных рыб не отмечено.

Под действием дозы в 50 Р митотическая активность в хрусталике в первые сутки после облучения снижается, а, начиная с 8 дня, возрастает. К концу опыта клеточная пролиферация в эпителии хрусталика глаза нормализуется. При этом митотический индекс становится близким к контролю.

Наибольшая митотическая активность после облучения отмечается в малодифференцированных зонах эпителия хрусталика, особенно в герминативной зоне. В то же время дифференцированные участки эпителия хрусталика, составляющие его периферические зоны, не отвечают столь бурным повышением митотической активности. Митотический индекс в предэкваториальной зоне, даже при самой высокой активности облучения не достигал более 1,3 (рис. 3.6).

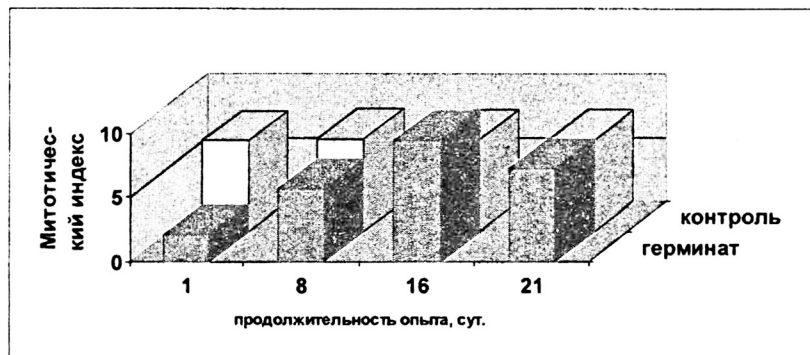


Рис. 3.6 Митотический индекс в эпителии хрусталика глаза радужной форели (герминативная зона) при облучении в дозе 50 Р (контроль по герминативной зоне).

Облучение годовиков радужной форели экспозиционной дозой 500 Р оказало более эффективное действие на митотическую активность эпителия хрусталика глаза. В первую неделю после облучения митотическая активность была подавлена по сравнению с контролем примерно в два раза. К 8 суткам отмечается небольшая стимуляция клеточной пролиферации. К 16 суткам

митотический индекс почти достигает контроля и к 21 суткам опыта стимулирующий эффект пропадает. При этом после облучения в хрусталике отмечаются аберративные митозы. Данные о влиянии облучения на митотическую активность в различных зонах цитодифференцировки хрусталика глаза представлены на рис. 3.6.1.

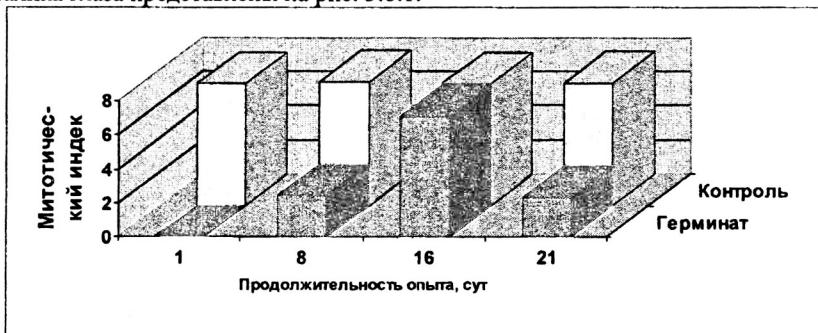


Рис. 3.6.1 Динамика митотической активности в герминативной зоне цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза годовиков радужной форели при облучении дозой 500 Р (контроль по герминативной зоне).

В следующем эксперименте годовиков радужной форели облучали при экспозиционной дозе 5000 Р, при этом поглощенная доза составила около 14 грей. Через 3 сут. после гибели половины облученных рыб оказалось, что данная доза облучения оказала отрицательное воздействие на митотическую активность в эпителии хрусталика глаза рыб. В первые сутки после облучения митозы были полностью подавлены, и клеточная пролиферация частично возобновилась только в герминативной зоне через 16 сут. В этой зоне отмечено появление нескольких аберративных митозов. Затем до конца опыта митотическая активность во всех зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика окончательно угасла.

Митозы, появившиеся в герминативной зоне эпителия хрусталика глаза годовиков радужной форели после облучения высокой дозой рентгеновских лучей, характеризуются фрагментацией хромосом и образованием мостов на стадии ана-телофазы.

Таким образом, клеточная пролиферация в эпителии хрусталика глаза рыб зависит от экспозиционной дозы облучения. Начиная с 500 рентген и выше нарушения митотической активности значительны, а при действии дозы 5000 Р появляется необратимый эффект воздействия рентгеновского облучения на клеточную пролиферацию.

3.7. Совместное действие травмы и рентгеновского облучения на митотическую активность в герминативной зоне эпителия хрусталика глаза рыб

В эпителии хрусталика левого глаза радужной форели без травмы митотический индекс составил 2,45. При нанесении травмы иглой в передний полюс хрусталика правого глаза митотический индекс за двое суток в

герминативной зоне поднялся до 6,3, в то время как в периферических частях эпителия произошло даже снижение этого индекса. Следует отметить, что митозы в эпителии хрусталика рыб в норме встречались как в малодифференцированных зонах – центральной (митотический индекс=0,09) и герминативной (митотический индекс=7,12), так и предэкваториальной зоне (митотический индекс=1,12), где дифференцировка клеток зашла уже далеко. На основании этого в дальнейшем мы изучали митотическую активность только в герминативной зоне, как наиболее активной.

При воздействии рентгеновского облучения на эпителий хрусталика радужной форели в дозах 50, 500 и 5000 Р нами было выявлено абсолютно во всех случаях ингибирование митозов после облучения, затем следовал период повышения митотического индекса и к 21 сут. митотическая активность либо возвращалась в норму, либо оставалась заниженной, как было отмечено ранее при воздействии высокой дозы в 5000 Р.

После травмирования переднего полюса хрусталика глаза в эксперименте в последующем действие рентгеновского облучения при низких дозах (50 Р) приводит к повышению количества митозов. Однако нанесение травмы в передний полюс хрусталика с последующим облучением высокими дозами (500, 5000 Р) отрицательно сказывается на величине митотического индекса в эпителии. Более четко выявляется фазность при одновременном действии облучения и травмы. Стимуляция митотической активности под воздействием травмы увеличивается после ингибирования рентгеновским облучением, но затем следует второй период подавления митотической активности, который при экспоненциальной дозе 5000 Р проявляется более выражено (табл. 3.7).

Таблица 3.7

Митотический индекс в герминативной зоне эпителия хрусталика глаза годовиков радужной форели при воздействии рентгеновского излучения и травматизации

Время фиксации после облучения и травмы, сут.	Митотический индекс в клетках эпителия хрусталика глаза					
	50 Р		500 Р		5000 Р	
	без травмы	травма	без травмы	травма	без травмы	травма
Контроль (особи без облучения)	7,12±0,22	8,2±0,34	7,12±0,28	8,2±0,34	7,12±0,28	8,2±0,34
1	2,04±0,31	2,5±0,27	0	0	0	0
8	5,66±0,42	6,4±0,30	2,45±0,35	3,4±0,25	0	0,8±0,16
16	9,46±0,37	10,4±0,28	7,04±0,33	7,5±0,19	2,8±0,24	3,1±0,21
21	7,23±0,28	7,7±0,36	0,8±0,21*	1,4±0,38*	0	0

Достоверные различия при $p \leq 0,01$: жирным шрифтом – при снижении митотического индекса, жирным курсивом – при стимуляции.

Таким образом, совместное действие рентгеновского облучения и травматизации хрусталика глаза годовиков радужной форели по разному

влияет на пролиферационную активность эпителия хрусталика глаза. Травмирование эпителия хрусталика в эксперименте во всех случаях приводит к повышению митотической активности в герминативной зоне, если сохраняется клеточная пролиферация после облучения. Однако наиболее четко эффект стимуляции митотический индекс проявляется на 16 сут. после совместного действия облучения дозой 50 Р и экспериментальной травмы. При облучении более высокими дозами происходит подавление митотической активности.

3.8. Регенерация эпителия хрусталика глаза рыб и амфибий после воздействия высоких доз радиации

Исследованы особенности регенерации эпителия хрусталика глаза радужной форели и травяной лягушки после экспериментальной травмы переднего полюса хрусталика, в том числе после дополнительного облучения.

У радужной форели экспериментальная травма приводит не только к перфорации капсулы хрусталика и повреждению его волокон, но и к гибели клеток эпителия вокруг травмы за счет механического воздействия. Площадь поражения эпителия составляет 0,3–0,4 мм² в зависимости от силы травмы. Процесс регенерации эпителия хрусталика сводится к тому, что в отдалении от травмы, а также в высокодифференцированных зонах, непосредственно около травмы, возрастает клеточная пролиферация. Однако травма закрывается не только за счет деления клеток, но и за счет миграции клеток эпителия в зону разрыва. При миграции клеток их ядра вытягиваются и приобретают веретенообразную форму. Через двое сут. травма закрывается за счет пролиферации и миграции клеток в область поражения. На третьи сутки эпителий полностью закрывает место поражения, но в области травмы еще имеются разреженные клетки эпителия; морфологическая перестройка продолжается еще сутки.

При нанесении травмы в передний полюс хрусталика рыб после облучения их рентгеновскими лучами с экспозиционной дозой 5 000 Р характер регенерации меняется. Под влиянием радиации митозы в эпителии хрусталика глаза радужной форели подавляются, и регенерация идет только за счет миграции клеток эпителия в зону его разрыва эпителия. При отсутствии клеточной пролиферации для закрытия травмы требуется большее число клеток, поэтому вокруг травмы на плоскостных препаратах эпителия хрусталика отмечается разреженная область, где плотность клеток невысока. В дальнейшем процесс заживления у облученных рыб завершается практически одновременно с необлученными.

У травяной лягушки травма переднего полюса хрусталика глаза приводит к поражению сходному с рыбами. Отличием можно считать только механическое повреждение. У лягушек кора хрусталика более мягкая и прогиб капсулы при ее перфорации приводит к большей площади поражения эпителия от механического воздействия вокруг укола иглой. Микрометрия показывает, что площадь поражения эпителия вокруг укола доходит до 0,6 мм², то есть она в два раза больше, чем у рыб. В летнее время, когда у лягушек исходно имеется

высокая митотическая активность в эпителии хрусталика, регенерация эпителия после травмы происходит сходно с рыбами. Эпителий восстанавливается за счет клеточной пролиферации и миграции клеток эпителия в область травмы.

При облучении травяной лягушки в экспозиционной дозе 10 000 Р митотическая активность клеток эпителия подавляется. Регенерация эпителия после воздействия высоких доз радиации, как и у рыб, происходит только за счет миграции клеток в область травмы. Активная миграция приводит к вытягиванию клеток эпителия и снижению плотности клеток вокруг травмы.

В осенне-зимний период у травяной лягушки клеточная пролиферация в эпителии хрусталика отсутствует. В этот период нанесение травмы иглой в передний полюс хрусталика глаза приводит к тому, что регенерация осуществляется только за счет миграции клеток в зону поражения, как при облучении дозой 10000 Р. Таким образом, регенерация травмированного эпителия у лягушек в осенне-зимний период происходит как при облучении высокими дозами радиации (10 000 Р).

Помимо указанных периодов, мы проследили переходный период, когда травяная лягушка выходит из зимней спячки и у нее восстанавливается клеточная пролиферация в эпителии хрусталика глаза. В конце апреля они были облучены на рентгеновской установке дозой 10 000 Р. Через трое сут. в эпителии хрусталика контрольной группы появились митозы, в то время как у облученных лягушек клеточная пролиферация в эпителии хрусталика отсутствовала. Нанесение травмы иглой в передний полюс хрусталика показало, что регенерация эпителия у необлученных особей идет за счет митотической активности и миграции клеток эпителия в область травмы. У облученных особей митозов не возникло, и регенерация эпителия происходила, как в зимнее время, т.е. только за счет миграции клеток эпителия в пораженную травмой зону.

Глава 4. Обсуждение результатов

В результате проведенных исследований установлено, что, несмотря на различный механизм возникновения хромосомных нарушений под воздействием разных поражающих агентов, возникает сходный цитогенетический ответ. Хромосомные aberrации при действии генотоксических соединений и рентгеновского облучения морфологически сходны. Этот же эффект отмечается и при исследовании пространственного распределения митозов по зонам цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза. Действие эндогенных ингибиторов, мутагенных токсикантов и рентгеновских лучей не специфично, в результате поражения мутагенными факторами - высокими концентрациями химических соединений и высокими дозами ионизирующего излучения в эпителии хрусталика глаза происходит снижение митотического индекса, особенно в герминативной зоне.

Удалось выявить фазность воздействия мутагенов с алкилирующими свойствами на митотическую активность в эпителии хрусталика глаза, в частности для эпихлоргидрина. Показано, что при понижении концентрации вещества в хроническом опыте может произойти стимуляция митотической

активности. Это вынуждает с большой осторожностью подходить к поиску недействующих концентраций токсикантов, и обязательно исследовать воздействие низких концентраций мутагенных веществ на распределение и количество митозов в эпителии хрусталика глаза рыб, а возможно и в других тканях гидробионтов.

Показано влияние генотоксичных агентов на размерные характеристики зон цитодифференцировки в эпителии хрусталика глаза радужной форели. Этот эффект можно выявить по оптической плотности гетерохроматина в ядрах клеток. В норме удалось показать, что оптическая плотность ядер каждой зоны цитодифференцировки выходит на плато, т.е. имеется три плато, соответствующие центральной, герминативной и предэкваториальной зонам. При действии генотоксичных веществ площадь герминативной зоны сокращается примерно на $\frac{1}{4}$ по сравнению с контролем за счет расширения высокодифференцированной зоны.

Рассмотрено совместное действие на цитогенетические показатели у гидробионтов травмы и лучевого фактора (рентгеновское излучение). Установлено, что поскольку за 2-3 сут. происходит регенерация хрусталика, при последующем облучении его воздействию подвергаются только делящиеся клетки с посттравматическими митозами. Посттравматические митозы синхронизированы, локализованы, большей частью, в герминативной зоне и дают возможность исключить из исследования митозы, в которых фаза S произошла до облучения. Объясняется это тем, что все митозы, кроме посттравматических, в эпителии хрусталика глаза с началом регенерации ингибируются. Ингибирование посттравматических митозов отмечено нами также при использовании высоких доз радиации: для рыб - до 5000 Р, для травяной лягушки - до 10000 рентген.

Под влиянием интенсивного рентгеновского излучения у гидробионтов, например у амфибий и рыб, могут возникнуть катаракты. В патогенезе катаракт, возникающих под воздействием химических и лучевых факторов, выявлены общие черты.

В результате проведения работы удалось также выявить необычное свойство центральной зоны эпителия хрусталика не увеличивать митотическую активность при травматизации. Митозы при травматизации центральной зоны возникают в герминативной зоне в отдалении от травмы, в то время как в высокодифференцированных участках эпителия хрусталика глаза клеточная пролиферация происходит непосредственно по краям травмы. При подобном распределении митозов можно говорить о специфичной регуляции пространственного распределения клеточной пролиферации в эпителии хрусталика.

Таким образом, нами выявлены особенности воздействия цитотоксических и мутагенных факторов, а также травматизации на структуру поличенных и митотических хромосом гидробионтов и пространственную регуляцию клеточной пролиферации в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика глаза рыб и амфибий. При этом найдены закономерности

пространственного распределения генетического материала в зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика по оптической плотности ядер. Отмечено, что при воздействии мутагенных веществ размеры герминативной зоны сокращаются, но при этом возрастает площадь высокодифференцированной предэкваториальной зоны.

Выявленные особенности действия генотоксичных загрязнителей, травматизации и рентгеновского излучения на хромосомный аппарат гидробионтов позволяют создать новые биотесты для выявления мутагенных факторов в водной среде и разработать экспрессные методы оценки вредных факторов, влияющих на клеточную пролиферацию.

Выводы

1. Генотоксичные вещества с различным механизмом действия на полигенные хромосомы хирономид и митотические хромосомы эпителия хрусталика глаза рыб и амфибий вызывают однотипные абберрации, включающие деструкцию и фрагментацию хромосом, а при митозе - поражение аппарата деления клетки, что ведет к нерасхождению хромосом и образованию мостов.
2. Мутагенные вещества влияют на герминативную зону цитодифференцировки хрусталика глаза рыб и вызывают сокращение ее размеров за счет увеличения площади высокодифференцированной предэкваториальной зоны.
3. Мутагенные факторы (токсиканты и рентгеновское излучение), подавляющие митотическую активность в эпителии хрусталика глаза рыб, оказывают основное влияние на герминативную зону, что приводит к резкому снижению митотического индекса, а при высоких дозах радиации (5000 Р) - к полному блокированию митозов.
4. Выявлены мутагены, например эпихлоргидрин, при действии которых проявляется фазность возникновения количества хромосомных аббераций и пролиферационной активности клеток в зависимости от концентрации токсиканта. При низких концентрациях наблюдается стимуляция митотической активности, а с повышением концентрации токсиканта - ингибирование митозов. Колебания величины митотического индекса и количества хромосомных аббераций в зависимости от концентрации мутагена совпадают по фазе.
5. Установлено свойство травмированной герминативной зоны эпителия хрусталика глаза рыб и амфибий, оказывать влияние на пространственное распределение посттравматических митозов. После травматизации митозы возникают не только в герминативной зоне, но и даже в предэкваториальной зоне на значительном расстоянии от краев травмы, а полоса митозов при этом принимает эллипсоидную форму.
6. Посттравматические митозы в эпителии хрусталика глаза рыб и амфибий блокируются высокими дозами рентгеновских лучей (5000-10000 Р) и регенерация эпителия хрусталика у рыб и травяных лягушек происходит только за счет миграции клеток в область травмы сходно с тем, как это

наблюдается при естественном блокировании митозов во время зимней спячки животного.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Симаков Ю.Г., Пенкин М.А. Влияние радиационного и естественного блокирования митозов на регенерацию эпителия хрусталика рыб и амфибий // Объединенный научный журнал, 2007. №11. С. 76-79.
2. Пенкин М.А., Симаков Ю.Г. Воздействие различных мутагенных веществ на политенные хромосомы хирономид // Объединенный научный журнал. 2007. №12, С. 76-79.
3. Пенкин М.А., Фельдман М.Г., Горбунов А.В. Действие генотоксичных загрязнителей на политенные хромосомы хирономид // "Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов - 2". Расширенные материалы Международной научно-практической конференции, Борок, 17-20 июля 2007. С. 393-397.
4. Пенкин М.А., Симаков Ю.Г., Никифоров-Никишин А.Л., Бородин А.Л. Фазность митотической активности и возникновения хромосомных aberrаций в эпителии хрусталика радужной форели при действии эпихлоргидрина // "Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов - 2". Расширенные материалы Международной научно-практической конференции, Борок, 17-20 июля 2007. С. 397-402.
5. Пенкин М.А., Симаков Ю.Г. Регенерация эпителия хрусталика рыб и амфибий при радиационном и естественном блокировании митозов // "Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов - 2". Расширенные материалы Международной научно-практической конференции, Борок, 17-20 июля 2007. С. 402-405.
6. Пенкин М.А. Пространственное распределение митозов при регенерации эпителия хрусталика радужной форели // Расширенные материалы международного симпозиума «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза», Москва, 9-11 октября 2007. С. 128-130.
7. Пенкин М.А., Симаков Ю.Г. Изменение цитологических показателей эпителия хрусталика радужной форели при загрязнении рыбохозяйственных водоемов // Рыбное хозяйство, 2008. №1. С.95.
8. Пенкин М.А., Симаков Ю.Г. Оценка генотоксичности загрязнителей рыбохозяйственных водоемов по цитологическим показателям эпителия хрусталика радужной форели // Вопросы рыболовства, 2008. Т. 9. № 3(35). С. 711-716.

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»

ПД № 1-00007 от 25.09.2000 г.

Подписано в печать 20.11.08.

Тираж 130 экз. Усл. п.л. 1,37

Печать авторефератов (495) 730-47-74, 778-45-60

10 -