

УДК 639.3

## ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ ПО ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ ЭПИТЕЛИЯ ХРУСТАЛИКА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

© 2008 г. Ю.Г. Симаков, М.А. Пенкин

*Московский государственный университет технологий и управления,  
кафедра «Биоэкологии и ихтиологии», Москва 117149*

Поступила в редакцию 11.07.2007 г.

Окончательный вариант получен 13.08.2007 г.

Целью исследований было определение связи между отклонением в цитодифференцировке различных зон эпителия хрусталика при действии мутагенных загрязнителей рыбохозяйственных водоемов. Действующие концентрации генотоксичных загрязнителей для эпителия хрусталика сеголеток радужной форели подбирались экспериментально для каждого вещества по таким показателям как проявление хромосомных aberrаций и статистически достоверное изменение митотического индекса (МИ). Исследование проведено с использованием двух мутагенных веществ: бензольного соединения 2-нафтола и эпихлоргидрина. Для получения цитогенетических тотальных препаратов эпителия хрусталика, после экспозиции рыб в растворах токсикантов, были взяты 55 сеголеток радужной форели (*Parasalmo mykiss*). МИ при действии пяти концентраций каждого вещества определялся в полосе митозов, вырезаемой окулярной сеточкой от центра до периферии эпителия хрусталика на 10 тотальных препаратах, полученных из правого и левого глаза рыб. Для исследования эпителиальных клеток хрусталика было применено фотографирование цифровой камерой отдельных фрагментов эпителия. Дальнейшее исследование проводили с помощью специально разработанной программы. Установлено, что наибольшие изменения происходят в герминативной зоне эпителия хрусталика сеголеток радужной форели. Проведенные исследования показывают возможность оценки воздействия на рыб неблагоприятных факторов, обладающих генотоксичными и цитотоксичными свойствами. Подобную оценку можно проводить путем исследования размеров зон цитодифференцировки эпителия хрусталика с применением денсиметрии для установления оптической плотности ядер.

В настоящее время в рыбохозяйственные водоемы попадает значительное количество веществ, обладающих мутагенными свойствами. Для сохранения генофонда рыб и поддержания рыбопродуктивности водоемов на стабильном уровне необходимо проводить оценку генотоксичности химических соединений попадающих в водоем с промышленными стоками. Генотоксичность веществ на хромосомном уровне, в большинстве используемых стандартизированных методов, определяется по aberrациям в митотических хромосомах либо на стадии ана-телофазы, либо по нарушению кариотипа в профазе (Макгрегор, Варли, 1986; Симаков, 1998). Эпителий хрусталика глаза рыб напоминает чистую, монослойную культуру клеток (Трумен, 1985). На тотальных препаратах эпителия хрусталика можно выделить три зоны цитодифференцировки: центральную, герминативную и предэкваториальную (Симаков, 1982). В центральной зоне находятся малодифференцированные эпителиальные клетки, у которых клеточная пролиферационная активность резко снижена. Далее к периферии следует герминативная зона, где отмечается

повышенная митотическая активность. Морфологически герминативная зона определяется по клеткам образующим неправильные концентрические фигуры. Наконец, на периферии препарата расположена предэкваториальная зона с самой высокой плотностью клеток, где клетки начинают выстраиваться в ряды, и готовятся к превращению в хрусталиковые волокна. Митотическая активность в этой зоне резко снижена.

Нами поставлена цель, найти связь между отклонением в цитодифференцировке различных зон эпителия хрусталика при действии мутагенных загрязнителей рыбохозяйственных водоемов. Действующие концентрации генотоксичных загрязнителей для эпителия хрусталика сеголеток радужной форели подбирались экспериментально для каждого вещества по таким показателям как проявление хромосомных aberrаций и статистически достоверное изменение митотического индекса (МИ).

Отличительной особенностью данного исследования является выявление действия малых концентраций токсикантов на пространственную цитодифференцировку эпителия хрусталика в хроническом опыте, что соответствует реальному влиянию загрязнителей на гидробионтов рыбохозяйственного водоема.

Исследование проведено с использованием двух мутагенных веществ бензолного соединения 2-нафтола и эпихлоргидрина. Каждое из указанных веществ попадает в водоемы с промышленными стоками и представляет прямую угрозу для жизни рыб и биоценоза водоема в целом (Пашин и др., 1983; Тарусов, 1987; Дурнев, 1998).

Для получения цитогенетических тотальных препаратов эпителия хрусталика, после экспозиции рыб в растворах токсикантов, мы взяли 55 сеголеток радужной форели (*Parasalmo mykiss*) (определение вида по Решетникову, 1998). Рыбы содержались в 20-литровых аквариумах по 5 особей. Форели из одного аквариума были контрольными и содержались в отстойной водопроводной воде, 25 рыб использовались для выявления действующих концентраций 2-нафтола и исследования влияния на размеры зон цитодифференцировки, и 25 рыб для выявления тех же показателей при действии эпихлоргидрина. Вода в аквариумах с указанными концентрациями загрязнителей менялась два раза в неделю и аэрировалась. Кормление рыб осуществляли мелким мотылем. Продолжительность опыта 21 день. По окончании опыта глаза рыб фиксировались смесью Карнуа (Лили, 1969), а затем готовились тотальные препараты эпителия хрусталика с окраской их гематоксилином Майера (Howard, 1952; Симаков, 1982). На полученных тотальных плоскостных препаратах эпителия хрусталика подсчитывалось количество хромосомных aberrаций и митотический индекс (МИ). МИ при действии пяти концентраций каждого вещества определялся в полосе митозов вырезаемой окулярной сеточкой от центра до периферии эпителия хрусталика на 10 тотальных препаратах, полученных из правого и левого глаза рыб.

Для исследования эпителиальных клеток хрусталика мы применили фотографирование цифровой камерой отдельных фрагментов эпителия, в виде полосы от центральной части до периферии по площади одного квадрата равной поля зрения в микроскоп окулярной сеточки. Дальнейшее исследование проводили с помощью специально разработанной программы IC для обработки на компьютере. Благодаря примененному приему, появилась возможность получить денситограммы оптической плотности клеток эпителия хрусталика в различных зонах цитодифференцировки. Таким образом, на каждом препарате в контроле и опыте

исследовались одинаковые площади эпителия хрусталика с идентичной цитодифференцировкой, равные 0,25 мм<sup>2</sup> (рис. 1).

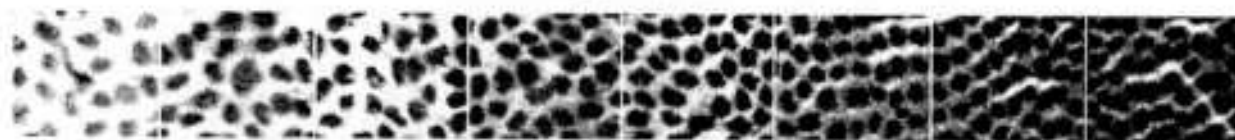


Рис. 1. Зоны цитодифференцировки эпителия хрусталика радужной форели от центра (слева) к периферии (справа).

Fig. 1. Regions cytodifferentiations of an epithelium of a crystalline lens of an iridescent trout from the centre (at the left) to periphery (on the right).

Интегральный показатель может быть выше у периферических клеток эпителия за счет образования гетерохроматина в ядрах в процессе дифференцировки, но сравнительный анализ исключает ошибку. При нарушении цитодифференцировки можно ожидать даже падение степени окрашивания ядер. Для выяснения степени окрашивания ядер использовалась денсиметрия, позволяющая косвенно говорить об образовании гетерохроматина в дифференцирующихся клетках предэкваториальной зоны эпителия хрусталика. Клетки эпителия хрусталика с высоким содержанием эухроматина отнесены нами к центральной зоне. Промежуточная зона с градицией эу- и гетерохроматина представляет собой герминативную зону, за размерами которой нами велось основное наблюдение.

Данные об исследовании хромосомных aberrаций и митотического индекса в эпителии хрусталика радужной форели после воздействия эпихлоргидрина представлены в таблице 1.

Таблица 1. Хромосомные aberrации (ХА) в эпителии хрусталика сеголеток радужной форели после экспозиции (21 день) в растворах эпихлоргидрина.

Table 1. Aberration chromosomes (XA) in a crystalline lens epithelium sеголеток an iridescent trout after an exposition (21 day) in solutions epichlorohydrina.

Концентрация, мг/л	ХА	Типы ХА			МИ*
		мосты	фрагм.	отстав.	
1,0	17	2	7*	8*	4,12*
0,5	10*	-	4*	6*	1,52*
0,1	4	1	2	1	3,31
0,05	5	2	1	2	3,20
0,005	6	3	2	1	3,12
Контроль	4	-	2	2	3,23

\* МИ - митотический индекс (количество митозов на 1000 клеток).

\*\* Достоверная разница средних ( $P = 0,95$ ;  $t_n = 2,45$ ;  $t_d = 2,78$ ).

Результаты исследований показывают, что при концентрации 0,5 мг/л наблюдается повышенное количество aberrативных митозов в эпителии хрусталика и падение митотического индекса, что говорит о мутагенном и цитотоксическом действии эпихлоргидрина в хроническом эксперименте. При концентрации 0,1 мг/л статистически достоверных отклонений по сравнению с контролем не происходит. Поэтому концентрацию 0,1 мг/л следует считать максимально допустимой. Не отмечено отклонений по сравнению с контролем и при концентрациях 0,05 и 0,005 мг/л. Концентрация 10 мг/л выступает как стимулирующая, а при 0,5 мг/л митозы ингибируются.



Для выявления генотоксичности 2-нафтола на хромосомном уровне мы использовали сеголеток радужной форели, которые в течение 21 дня находились в растворах 2-нафтола. В этом случае проверялась мутагенная активность вещества на эпителии хрусталика рыб в хроническом опыте. Данные об исследовании хромосомных aberrаций и об изменении клеточной пролиферации в эпителии хрусталика радужной форели в хроническом опыте после воздействия различных концентраций 2-нафтола представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Хромосомные aberrации (ХА) и митотический индекс (МИ) в эпителии хрусталика годовиков радужной форели после экспозиции (21 день) в растворах 2-нафтола.

**Table 2.** Aberration chromosomes (ХА) and a mitotic index (МИ) in a crystalline lens epithelium godovikov an iridescent trout after an exposition (21 day) in solutions 2-naftola.

Концентрация, мг/л	ХА	Типы ХА			МИ*
		мосты	фрагм.	отстав.	
0,2	12	2	4*	6**	0,63**
0,1	7	1	2	4*	1,5**
0,01	5	-	2	3	2,48
0,001	4	1	1	2	2,50
Контроль	4	-	2	2	3,23

\* МИ - митотический индекс (количество митозов на 1 000 клеток).

\*\* Достоверная разница средних ( $P = 0,95$ ;  $t_u = 2,45$ ;  $t_d = 2,78$ ).

Результаты исследований показывают, что при наибольшей концентрации 2-нафтола наблюдается повышенное содержание aberrативных митозов в эпителии хрусталика и падение митотического индекса, что говорит о мутагенном и цитотоксическом действии исследуемого вещества в хроническом эксперименте. Возможно, 2-нафтол нарушает нити веретена деления. При концентрации 0,1 мг/л генотоксичный эффект не проявляется, зато отмечается стимуляция митотической активности (МИ=4,45 в опыте, в то время как в контроле МИ=2,66) отклонений в указанных биологических показателях не происходит. Поэтому концентрацию 0,1 мг/л следует считать максимально допустимой по действию на генный аппарат рыб, но в цитологическом плане, эта концентрация не может считаться допустимой, так как она вызывает увеличение клеточной пролиферации. При более низких концентрациях, начиная с 0,01 мг/л и ниже, 2-нафтол не проявляет генотоксичности и не нарушает механизмов клеточной пролиферации.

Определение размеров зон дифференцировки эпителия хрусталика рыб по оптической плотности проводилось при активно действующих концентрациях, установленных в результате экспериментов: для эпихлоргидрина – 0,5 мг/л, для 2-нафтола – 0,1 мг/л.

Денсиметрия различных зон дифференцировки эпителия хрусталика у 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. 2).

При действии эпихлоргидрина и 2-нафтола в концентрациях, вызывающих хромосомные aberrации и изменение МИ, отмечается сокращение размеров герминативной зоны по сравнению с контролем на 20-25 % (рис. 2).

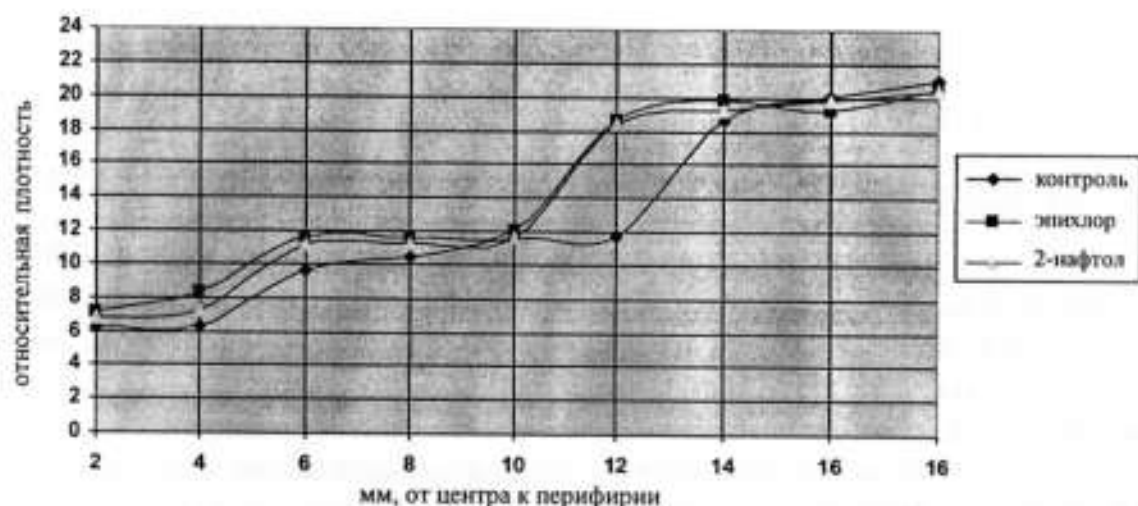


Рис. 2. Оптическая плотность ядер эпителия хрусталика в различных зонах цитодифференцировки в контроле и при действии эпихлоргидрина (0,5 мг/л) и 2-нафтола (0,1 мг/л).

Fig. 2. Absorbency of kernels of an epithelium of a crystalline lens in various regions cytodifferentiations in the control and at action epichlorohydrina (0,5 mg/l) and 2-naftola (0,1 mg/l).

Выявленная особенность может указывать на цитотоксическое действие исследуемых веществ, при котором размеры активной в пролиферационном отношении зоны сокращаются. Можно предположить также существование другого механизма, приводящего к сокращению размеров герминативной зоны. При неблагоприятном воздействии нарушаются процессы пространственной цитодифференцировки различных зон эпителия хрусталика. Клетки предэвентуриальной зоны начинают дифференцироваться раньше из-за падения митотической активности в герминативной зоне, что ведет к увеличению размеров высоко дифференцированной зоны хрусталика.

Сравнительный анализ цитодифференцировки эпителия хрусталика у исследуемых рыб показывает, что нарушение дифференцировки клеток и сокращение размеров герминативной зоны у рыб, находящихся в действующих концентрациях и эпихлоргидрина и 2-нафтола приблизительно сходны между собой.

Таким образом, удалось выявить, что процессы цитодифференцировки в эпителии хрусталика связаны и с химической природой мутагенного вещества, загрязнителя водной среды, и с состоянием герминативной зоны, где отмечается наиболее интенсивная клеточная пролиферация. Одновременно с сокращением герминативной зоны цитодифференцировки изменяется и митотический индекс, происходит его падение, что может быть связано с сокращением площади герминативной зоны.

Установлено, что наибольшие изменения происходят в герминативной зоне эпителия хрусталика сеголеток радужной форели. Площадь герминативной зоны сокращается под влиянием веществ, обладающих цитотоксическими свойствами. Появляется возможность проводить сравнительный анализ генотоксичных соединений, и по степени сокращения размеров герминативной зоны эпителия хрусталика, судить о генотоксичности и цитотоксичности исследуемого вещества.

Проведенная работа показывает возможность оценки воздействия на рыб неблагоприятных факторов, обладающих генотоксичными и цитотоксичными свойствами. Подобную оценку можно проводить путем исследования размеров зон

цитодифференцировки эпителия хрусталика с применением денсиметрии для установления оптической плотности ядер.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). М.: Медицина, 1998. 328 с.
- Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 645 с.
- Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир, 1986. 245 с.
- Писан Ю.В., Козаченко В.И. и др. Химические мутагены окружающей среды. М.: Наука, 1983. 138 с.
- Решетников Ю.С. (под ред.) Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России. М.: Наука, 1998. 220 с.
- Симаков Ю.Г. Влияние бензольных соединений на митотическую активность эпителия хрусталика радужной форели *Salmo gairdneri* Rich // Вопросы ихтиологии. 1982. Т. 22. Вып. 1. С. 139-144.
- Симаков Ю.Г. Оценка генотоксичности загрязняющих веществ. Сб. Метод. указ. по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ). М.: ВНИРО, 1998. С. 91-102.
- Тарусов В.С. Канцерогенные вещества. Справочник. М.: Медицина, 1987. 146с.
- Трумен Д. Биохимия клеточной дифференцирован. М.: Мир, 1976. 168 с.
- Howard A. Whole mounts of rabbit lens for cytological study // Stain technol. 1952. V.27. Pp. 313-317.

#### ASSESSMENT GENOTOXICITY CONTAMINANTS THE FISHECONOMIC RESERVOIRS ON CYTOLOGY INDICATORS OF AN EPITHELIUM OF A CRYSTALLINE LENS OF AN IRIDESCENT TROUT

© 2008 y. J.G. Simakov, M.A. Penkin

*The Moscow state university of technologies and managements,  
Faculty «Bioecologies and ichthyologies», Moscow*

Communication definition between a deflection in a cytodifferentiation of various regions of an epithelium of a crystalline lens at action of mutagen contaminants fisheconomic reservoirs was the purpose of researches. Reacting concentrations the genotoxic contaminants for an epithelium of a crystalline lens of a segoletok of an iridescent trout were selected experimentally for each material on such indicators as exhibiting of aberration chromosomes and statistically authentic change of a mitotic index (MI). Research is spent with use of two mutagen materials: the benzene bonds 2-naftola and a epihlorgidrina. For reception of cytogenetically whole mounts of an epithelium of a crystalline lens, after an exposition of fishes in solutions toksikantov, were are taken 55 segoletok of an iridescent trout (*Parasalmo mykiss*). MI at action of five concentrations of each material it was defined in a strip of mitoses, cut out the ocular by a reticulum from the centre to periphery of an epithelium of a crystalline lens on 10 whole mounts received from the right and left eye of fishes. Photographing by the digital chamber of separate fragments of an epithelium has been applied to research of epithelial cages of a crystalline lens. The further research spent by means of specially developed program. It is established, that the greatest changes descend in germinativnoj to region of an epithelium of a crystalline lens of a segoletok of an iridescent trout. The carried out researches show possibility of an assessment of influence on fishes of the unfavorable factors possessing genotoxicity and cytotoxic properties. A similar assessment it is possible to carry out by research of the dimensions of regions cytodifferentiations of an epithelium of a crystalline lens with application densimetrii for an establishment of absorbency of kernels.