

© Е.В. ЕФРЕМОВА, Т.И. МОИСЕЕНКО, А.Г. СЕЛЮКОВ,
С.Ю. ГОГОЛЕВА

katerinaef@yandex.ru, moiseenko@geokhi.ru, ags-bios@yandex.ru, ags-bios@yandex.ru

УДК 597.5:57.017.642:57.044

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ У ЭМБРИОНОВ СИГОВЫХ РЫБ В УСЛОВИЯХ ФЕНОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

АННОТАЦИЯ. Исследовали влияние хронического воздействия фенола в концентрациях 10 мг/л и 20 мг/л на развитие первичных половых клеток у сига и его гибрида с рипусом в период органогенеза. Установлено, что в опытных партиях после перевода в свежую воду у сига увеличилось число ППК и появлялись резорбирующиеся гоноциты, а у гибрида происходила дезинтеграция ядрышек ППК. Пребывание эмбрионов в чистой воде после интоксикации не компенсирует, а только замедляет отклонение развития; нарушение первичных гоноцитов видоспецифично и дозозависимо.

SUMMARY. The effect of chronic influence of phenol at concentration of 10 mg/l and 20mg/l for development of primordial germ cells in the embryos of Lake Chud whitefish and its hybrid with Lake Ladoga cisco (ripus) has been explored. The stay of embryos in clean water after intoxication does not compensate, but only decelerates violation of their development; disturbance of primordial gonocytes is species-specific and dose-dependent.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Сиговые рыбы, эмбриогенез, первичные половые клетки, фенол.

KEY WORDS. Whitefishes, embryogenesis, primordial germ cells, phenol.

В условиях возрастающих антропогенных нагрузок на гидроэкосистемы наиболее уязвимыми оказываются ранние стадии развития рыб [1]; [2]; [3] с еще не сформировавшимися механизмами токсикорезистентности. Среди представителей высшего трофического уровня пресноводных экосистем сиговые рыбы являются наименее устойчивыми к интоксикации. В Обь-Иртышском бассейне основные нерестилища этих видов расположены в пока еще чистых уральских притоках Нижней Оби. Однако уже в ближайшие годы техногенное давление на них многократно возрастет в результате реализации мегапроекта «Урал промышленный — Урал Полярный». Запланированные масштабные разработки месторождений минерального сырья, строительство рабочих поселков, автомобильных и железной дорог в верховьях нерестовых рек и вырубка лесов на водосборах [4] станут основным фактором деградации водных экосистем. При этом будут уничтожены или загрязнены нерестилища этих ценных видов, что приведет к их повсеместному сокращению. Вследствие этого возникла настоятельная необходимость в установлении возможных рисков и последствий токсикологической нагрузки на ранний онтогенез и перспективы существования сиговых рыб в условиях постоянной или кратковременной интоксикации наиболее распространенным поллютантом — фенолом.

Цель работы заключалась в оценке морфофункциональных изменений зародышей сига и его гибрида с рипусом под влиянием хронической фенольной интоксикации и выявлении цитоморфологических особенностей герминативных стволовых клеток в этих условиях.

Ее реализация сводилась к решению следующих **задач**:

1. Охарактеризовать морфодинамику эмбрионов сига и гибрида сиг x рипус в период органогенеза после месячной экспозиции в растворе фенола разных концентраций и последующего пребывания в чистой среде.

2. Проанализировать состояние герминативных стволовых (первичных половых — ППК) клеток у исследуемых зародышей сиговых рыб.

Материал и методы. С ноября 2010 г. по март 2011 г. на базе полигона водных биотехнологий биологического факультета Тюменского государственного университета был поставлен эксперимент по влиянию фенола на эмбриогенез сига *Coregonus lavaretus maraenoides* и его гибрида с рипусом *Coregonus albula* infrsp. *ladogensis* (далее — гибридная форма).

Оплодотворенная икра сига и гибрида была доставлена из Челябинской области (Аргазинское водохранилище) и помещена в инкубационные аппараты автоматизированной установки замкнутого водоснабжения. Спустя 30 суток, на этапе органогенеза, зародыши сига и гибридной формы (по 30 экз. в 3 повторностях на каждый вариант и контрольную партию) были помещены в чашки Петри с периодически сменяемой средой. Растворы фенола были представлены в двух концентрациях: 0.01 мг/л (1 вариант) и 0.02 мг/л (2 вариант). Чистая вода в контроле и растворы в эксперименте менялись каждые 3 суток, измерения температуры проводили ежедневно. После 30-суточной экспозиции, через 61 сутки после оплодотворения, зародыши вновь были переведены в чистую воду, а на 154 сутки эксперимент завершили.

Под бинокуляром МБС-10 (56Ч) описывали морфологические особенности всех развивающихся зародышей и фиксировали в смеси Буэна для гистологического анализа. Материал обезвоживали в спиртах и через хлороформ-парафин на установке ЕС-350 («Mісrom») заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм готовили на микротоме НМ 355S («Mісrom»), окрашивали железным гематоксилином по Гейденгайну и заключали в среду BioMount («BioOptica»). Препараты анализировали на микроскопе AxioImager A1 («Zeiss») при увеличениях 200Ч, 400Ч и 1000Ч с использованием ПО AxioVision 4.7.1. («Zeiss»).

Было проанализировано 561 первичная половая клетка (ППК) у зародышей сига и 217 — у гибридной формы. Измерения и фотографирование проводили с помощью видеокамеры AxioCam MRc5 («Zeiss»). Для статобработки использовали электронные таблицы MS Excel (2005).

Результаты. В начале инкубации развитие зародышей проходило при температуре воды 3-4°C. В дальнейшем она понижалась до 1.0-0.2°C, варьируя в пределах 0-1.5°C к концу эксперимента (рис. 1).

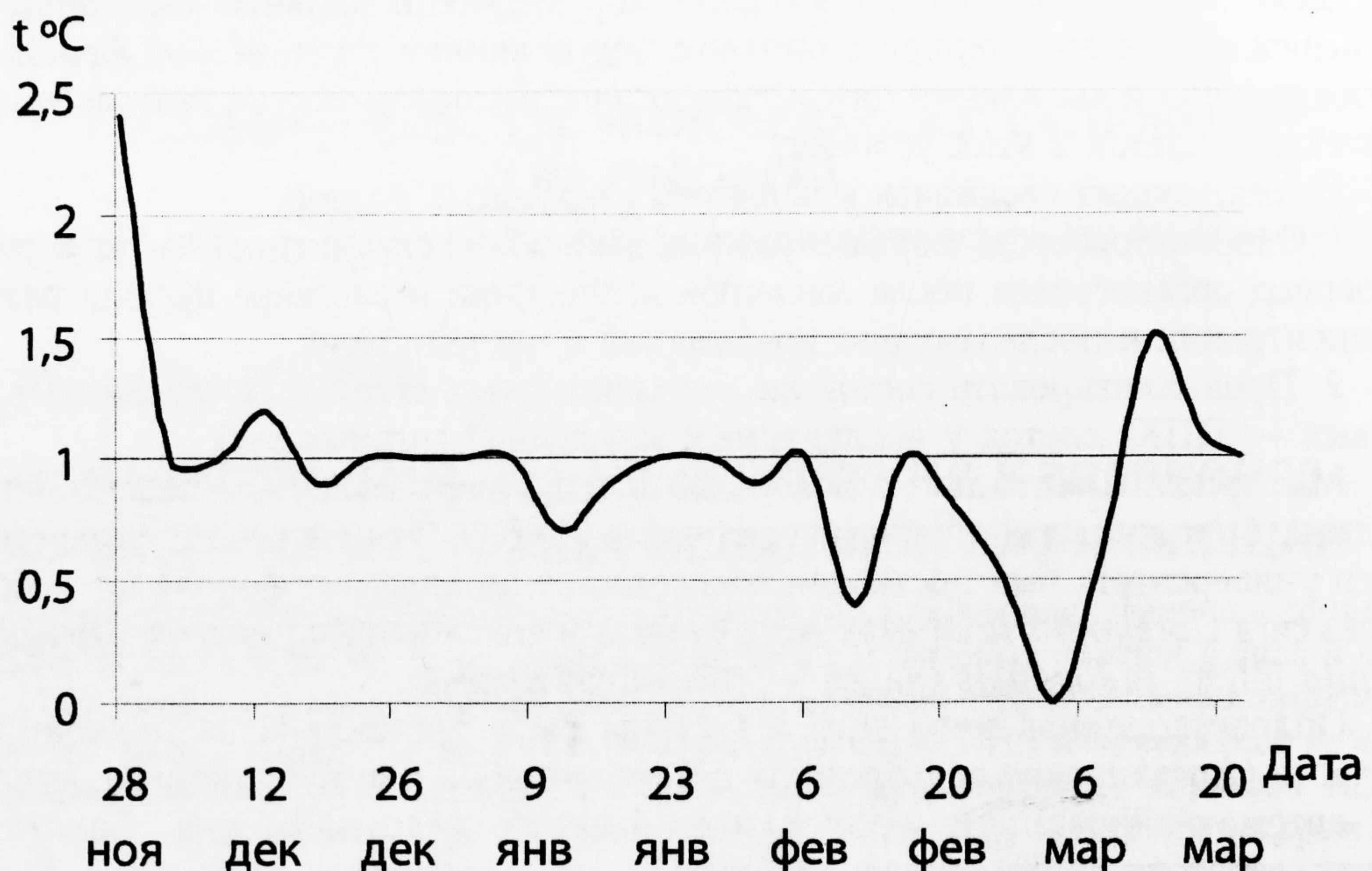


Рис. 1. Температурный режим в течение эксперимента

Морфодинамика зародышей сига и гибридной формы в условиях фенольной интоксикации

Сиг. 61 сутки после оплодотворения. Если у подвижных контрольных эмбрионов кровь бледно-розового цвета, а глаза интенсивно пигментированы, то у зародышей из 1 варианта кровь остается бесцветной и слабо пигментированы глаза. Во 2 варианте зародыши неподвижны, кровь и глаза бесцветны, а позвоночник в хвостовом отделе искривлен; все эмбрионы и их органы меньших размеров. В таком состоянии находились подопытные особи перед переводом в чистую воду. Их смертность в обоих вариантах была незначительной, возрастая к концу эксперимента.

94 суток. У контрольных зародышей все системы органов характеризуются высокой степенью сформированности, тогда как в опытных партиях месячное пребывания в чистой воде не компенсирует ранее выявленные отклонения.

В **128 суток** контрольные эмбрионы хорошо развиты и весьма активны, а у интоксигированных зародышей обеих партий даже после двухмесячного пребывания в чистой среде функциональные характеристики продолжают снижаться. В 1 варианте эмбрионы почти не двигаются, боковые участки головы у части особей подвержены водянке. Зародыши во 2 варианте неподвижны, у них бесцветная кровь и нарушена пигментация глаз.

Гибридная форма. На **61 сутки** эмбрионального развития проявляются те же признаки, которые отмечены в этот период у сига. У разных особей 1 варианта в крови отсутствует гемоглобин и слабо пигментированы глаза. У неподвижных зародышей во 2 варианте сердце не пульсирует, глаза почти лишены пигмента. Опытные эмбрионы имеют небольшие размеры и слабо развитые органы.

94 суток. У зародышей контрольной партии сердце активно пульсирует; тело и частично желточный мешок пигментированы. В это время у опытных зародышей обоих вариантов отмечается слабая пигментация тела.

Еще через месяц, в 128 суток, контрольные зародыши активно работают грудными плавниками, у них хорошо развита кровеносная система и сосудистая сеть желточного мешка, тело и голова пигментированы. В это время зародыши в 1 варианте почти неподвижны, кровь розоватого цвета и слабо пигментировано тело. Эмбрионы во 2 варианте по-прежнему неподвижны; кровь бесцветна, а меланиновый пигмент в глазах разрушается.

Таким образом, в условиях фенольной интоксикации у эмбрионов сиговых рыб даже после 2-месячного пребывания в чистой, хорошо аэрируемой воде улучшений не наблюдается и со временем наступает летальный исход. При этом у зародышей гибридной формы угнетающее действие токсиканта наиболее выражено на поздних стадиях развития.

Исследование *первичных половых клеток у сига и гибридной формы при фенольной интоксикации* стало очередной задачей.

Известно, что токсические воздействия на ранних стадиях зародышевого развития сопровождаются гистопатологическими изменениями половых желез у сеголеток [3], [5], что приводит к стерильности или уродству потомства. При анализе контрольных и экспериментальных партий эмбрионов сига и гибрида были установлены определенные различия в количестве и цитоморфологических состояниях первичных гоноцитов.

Сиг. У зародышей контрольной партии количество ППК варьирует незначительно (рис. 2а; табл.), нередко встречаются полиморфноядерные гоноциты и герминативные синцитии (рис. 3а) — предполагаемая форма т.н. полиплоидизирующего митоза [6]. Половых клеток у сига в 1 варианте вдвое больше их числа в контроле (табл.), доля полиморфноядерных ППК возрастает, а синцитиев (рис. 2б) — снижается (рис. 3а). Количество ядрышек совпадает с их числом в половых клетках контрольных особей; при этом их структура не изменяется. Среднее количество ППК у зародышей во 2 варианте также намного выше, чем в контроле, но особенно много синцитиальных структур, которые выявлены почти у всех особей (рис. 4а). В их составе присутствуют полиморфноядерные гоноциты (рис. 3в), а у отдельных зародышей герминативные синцитии распадаются и ППК превращаются в клеточный детрит (рис. 3г). В отличие от предыдущих партий, в данном варианте ППК встречаются вблизи головного отдела.

Повышение количества первичных гоноцитов вследствие их более интенсивного обособления и возрастания пролиферации, сопровождающееся увеличением числа полиморфноядерных ППК и синцитиев, ускорение их миграции к зачатку гонад — все это может свидетельствовать об интенсификации метаболизма под влиянием фенола. Дальнейшее развитие зародышей при тех же концентрациях истощает ресурсы организма (см. выше) и ведет к поражению половых клеток, как это показано у части особей.

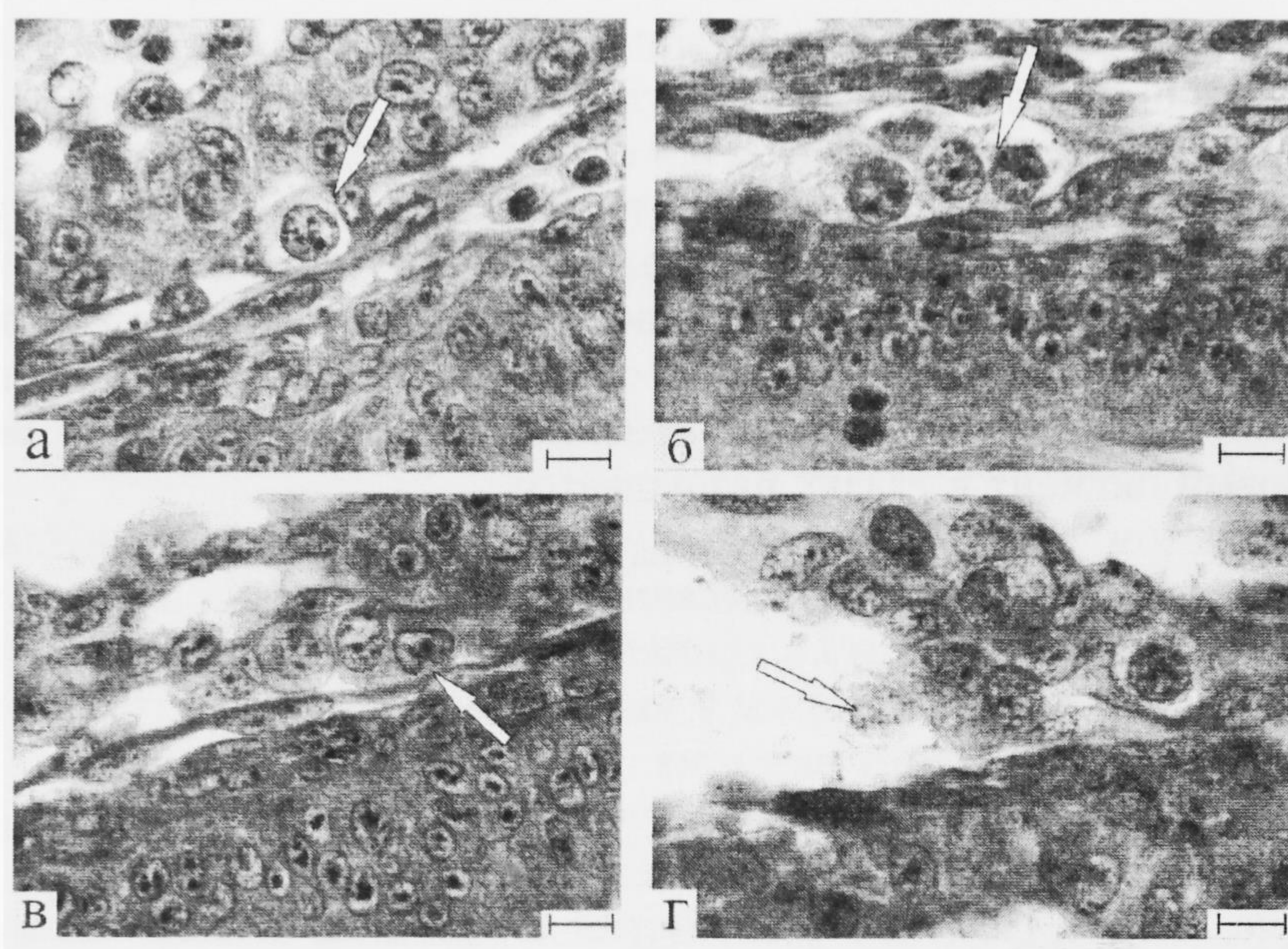


Рис. 2. Первичные половые клетки у зародышей сига в контроле и эксперименте на 94 сутки после оплодотворения

- а — ППК (стрелка) во время миграции в область зачатка гонад; контроль;
 б — в герминативном синцитии видны крупные ППК; 1 вариант;
 в — в герминативном синцитии полиморфноядерная ППК; 2 вариант;
 г — часть синцитиев распадается, а гоноциты подвергаются деструкции (стрелка); там же. Масштаб: 10 мкм.

Таблица 1

Цитометрические показатели ППК у эмбрионов сига и гибридной формы в эксперименте с фенолом (94 сутки после оплодотворения)

Вид	Вариант (число изученных ППК)	Количество ППК	$D_{\text{ппк}}$, мкм	$d_{\text{ядра}}$, мкм	Количество ядрышек
		$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ min-max	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ min-max	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ min-max	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ min-max
Сиг	Контроль (101)	25.30 ± 7.1 16-46	13.9 ± 0.3 12.1-17.2	9.2 ± 0.1 8.4-10.1	2.2 ± 0.1 1-4
	Вариант 1 (208)	52.0 ± 18.5 28-107	13.6 ± 0.2 11.0-16.5	8.9 ± 0.1 7.7-10.3	2.2 ± 0.1 1-4
	Вариант 2 (252)	50.4 ± 5.6 34-67	13.9 ± 0.2 11.1-17.2	8.9 ± 0.1 7.5-10.8	1.9 ± 0.1 1-4
Гибрид- ная форма	Контроль (99)	24.8 ± 9.8 3-48	13.4 ± 0.2 9.8-17.3	9.0 ± 0.1 7.0-10.6	1.7 ± 0.1 1-3
	Вариант 1 (70)	$17.5.0 \pm 4.3$ 10-30	13.9 ± 0.5 10.9-17.6	9.3 ± 0.2 7.9-10.7	2.0 ± 0.1 1-3
	Вариант 2 (48)	16.0 ± 6.4 6-28	14.3 ± 0.4 11.1-18.1	9.2 ± 0.2 7.9-10.6	1.6 ± 0.1 1-3

Примечание: во всех вариантах объем выборки составлял 4-6 экз.

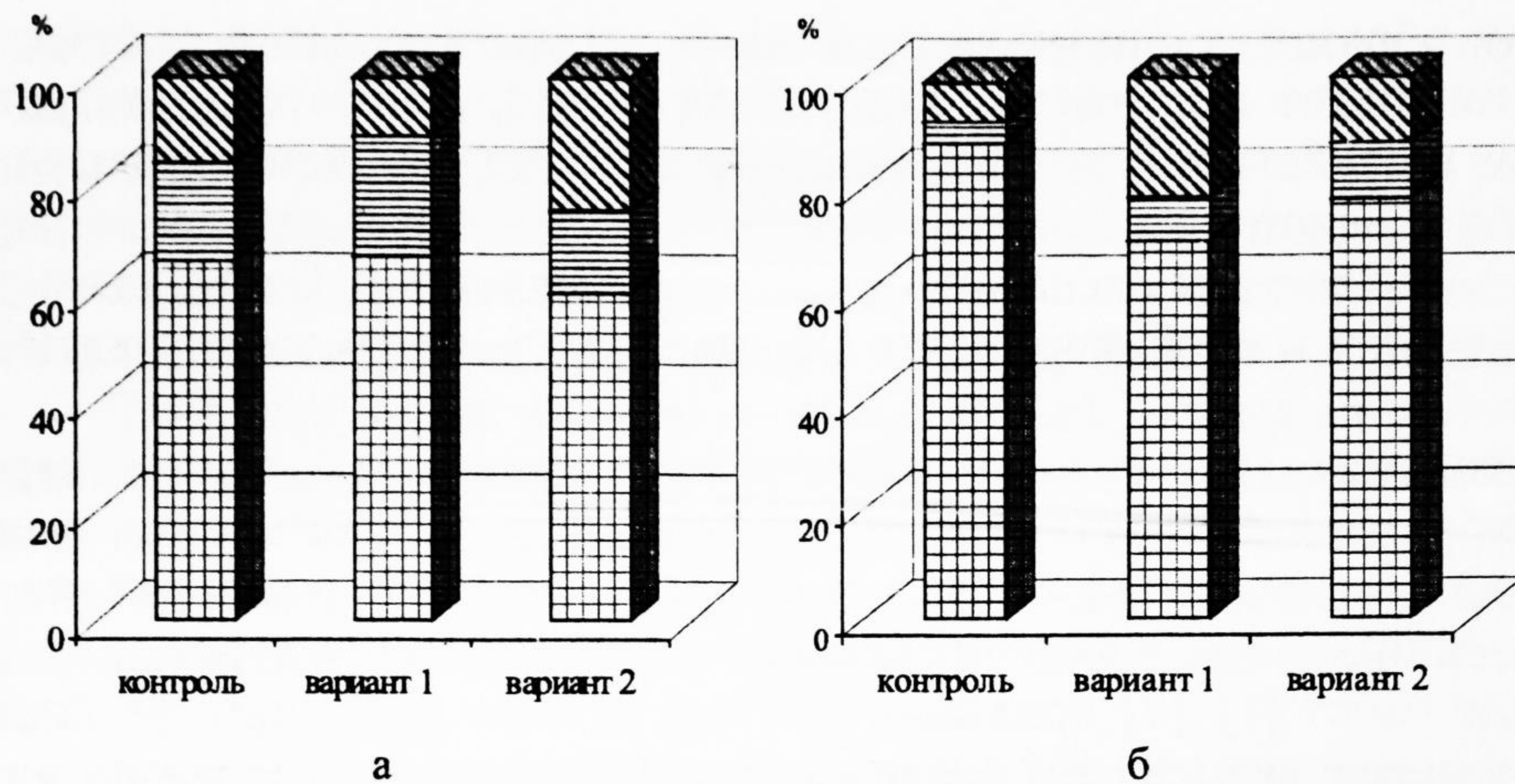


Рис. 3. Соотношение (%) разных состояний первичных гоноцитов у эмбрионов сига (а) и гибридной формы (б) в контрольной и экспериментальных партиях.
 ■ — типичные ППК; ▨ — полиморфноядерные ППК; ▩ — герминативные синцитии

Гибридная форма. У контрольных зародышей большинство ППК имеет округлые ядра с центрально расположенными ядрышками (табл.; рис. 4а). У эмбрионов в 1 варианте при меньшем числе гоноцитов возрастает доля герминативных синцитиев (рис. 3б) и полиморфноядерных ППК (рис. 4б). Во 2 варианте доля синцитиев снижается, но присутствуют клетки с отклонениями в структуре ядрышек настолько, что можно наблюдать своеобразную цепочку перехода от обычного состояния к многолопастной конфигурации с последующим пикнозом (рис. 4в) и начальными фазами дезинтеграции (рис. 4г).

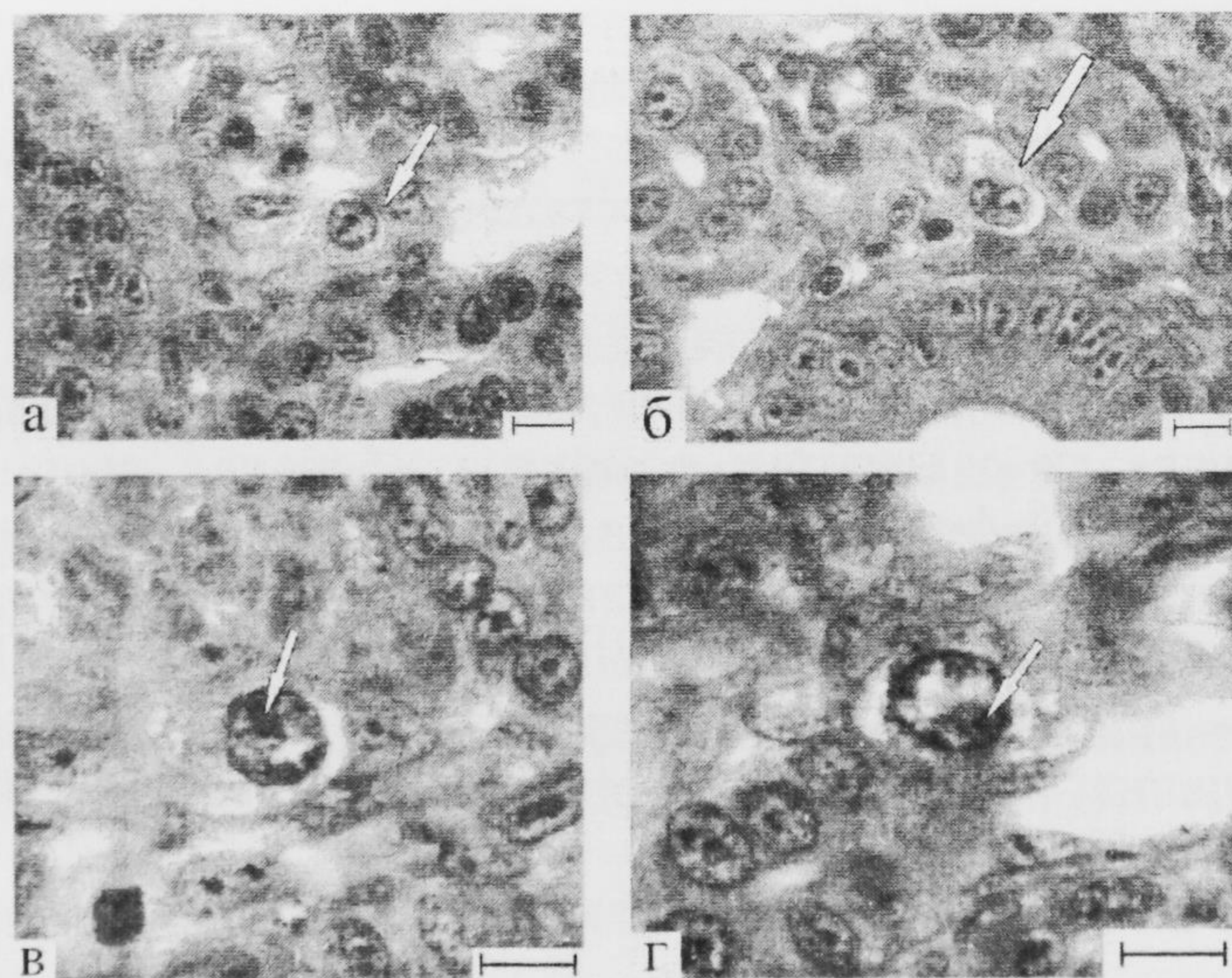


Рис. 4. Первичные гоноциты и состояние ядрышек у зародышей гибридной формы контрольной и опытных партий на 94 сутки после оплодотворения
 а — первичная половая клетка (стрелка) контрольной особи во время миграции в область половых гребней;
 б — полиморфноядерная ППК (стрелка) под Вольфовым протоком зародыша из 1 варианта;
 в, г — пикноз и дезинтеграция ядрышек (стрелки), конденсированный хроматин распределен по периферии ядра; то же. Масштаб: 10 мкм.

Таким образом, у проанализированных видов изменяется количество первичных гоноцитов и их состав, видоспецифичность которого усиливается хроническим воздействием фенола. У зародышей сига при концентрации фенола 0.02 мг/л в некоторых герминативных синцитиях отмечены дегенерирующие ППК, а сами кластеры распадаются на отдельные клетки. Отклонения у гибрида проявляются в иной форме, что хорошо заметно в состоянии ядрышкового аппарата.

Обсуждение. Проведенные исследования по влиянию фенола на зародышей сига и гибридной формы (сиг х рипус) позволили получить новые данные по особенностям видоспецифической реакции на интоксикацию как на уровне целого организма, так и формирующейся линии половых клеток.

В ряде работ [1]; [2] показано, что чем раньше эмбрионы начинали подвергаться интоксикации, тем более глубокие изменения отмечались у предличинок. Это указывает на большую чувствительность ранних стадий зародышевого развития к действию токсикантов, что трудно установить визуально. Наиболее чувствительными оказывались первые минуты после оплодотворения и этап дробления. Также именно в ранний эмбриональный период обособляются тотипотентные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые обеспечивают развитие двух основных линий — половых клеток и всех типов соматических клеток [7]. В поставленном эксперименте выбор относительно устойчивых состояний (этап органогенеза и стадия пигментации глаз) был вызван необходимостью выявления степени поражения зародыша применяемыми концентрациями фенола на данном этапе развития при типично низких температурах — в качестве модели при инкубации сиговых в естественных водоемах, подвергающихся относительно продолжительной интоксикации с последующим освежением воды.

Как можно видеть, даже при околонулевых температурах, когда для экотермных организмов токсичный эффект должен быть невысок, метаболизм в зародышевый период оказывается достаточным, чтобы провоцировать продолжающееся угнетение развития даже после перевода в чистую среду, сопровождающееся неизбежными уродствами и гибелью.

Установленные различия в токсикорезистентности зародышей исследуемых сиговых рыб показали различную реакцию эмбрионов природного вида, в сравнении с гибридной формой. У сига возрастала доля синцитиев, и у некоторых отмечался их распад, тогда как у гибрида дезинтеграция ядрышек ППК с последующим их исчезновением начиналась сегрегацией ядрышковых компонентов — гранулярно-фибрилярного и фибриллярного центра, что ведет к прекращению синтеза рибосомных РНК: 28S рРНК, 18S рРНК, 5.8S рРНК и 5S рРНК [8].

Выявленный эффект стимуляции формирования ППК у зародышей сига при фенольной интоксикации согласуется с данными, полученными на плотве [3], у которой значительная часть сеголеток, подверженных воздействию хлорофосом и фенолом в эмбриональный период, не уступала, а в ряде случаев превосходила биологические показатели рыб из контрольных групп. Однако немало подопытных сеголеток имели гистопатологические изменения гонад вследствие интоксикации в период эмбриогенеза. Эти результаты, как

и наш эксперимент, отчетливо продемонстрировали классическую триаду общего адаптационного синдрома (ОАС) Г. Селье [9].

Определенные нарушения ультраструктуры ППК могут быть выявлены уже в эмбриональный период. Проведенные исследования по влиянию кадмия и фенола на тонкие механизмы развития половых клеток морских ежей [10] показали, что содержание токсикантов, даже намного ниже ПДК (для фенола — 0.001 мг/л, для кадмия — 0.005 мг/л), оказывает комплексное повреждающее воздействие на ультраструктуру их половых клеток. Исследованиями было обнаружено разрушение половых детерминантов в сперматогониях и «стерилизация» половых клеток, а также признаки дисфункции вспомогательных клеток при общем снижении репродуктивной способности организма [10], [11], [12].

Таким образом, хроническое влияние фенола и других токсикантов на зародышевое развитие рыб и беспозвоночных гидробионтов оказывает угнетающее воздействие на морфогенез, а кратковременная пролиферативная активность первичных гоноцитов сопровождается нарушением их структуры и подавлением репродуктивной системы на последующих этапах онтогенеза.

Выводы

1. После месячного пребывания зародышей сига и гибрида сиг х рипус на этапе органогенеза в растворах фенола (0.01 мг/л и 0.02 мг/л) последующее их развитие в чистой воде не компенсировало патологические изменения в головном отделе и осевом скелете; при повышенной концентрации фенола эмбрионы оставались неподвижны, у них отсутствовал гемоглобин в крови, нарушались пигментация глаз и кожных покровов.

2. У зародышей сига и гибридной формы из 1 варианта (раствор фенола 0.01 мг/л, далее — чистая вода) отмечены определенные различия: у сига возрастает число ППК и доля полиморфноядерных клеток; у гибрида снижается число первичных гоноцитов, но увеличивается количество герминативных синцитиев.

3. При более высокой концентрации фенола (0.02 мг/л) у зародышей сига происходит увеличение числа синцитиев, а у части особей их распад и деструкция ППК, у гибрида — снижение числа половых клеток и нарушение ядрышкового аппарата, что отражает дозозависимый характер и видоспецифические особенности при формировании линии половых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данильченко О.П., Строганов Н.С. Оценка токсичности веществ, спускаемых в водоемы, для раннего онтогенеза рыб // Вопр. ихтиологии. 1975. Т. 15. Вып. 2. С. 346-355.

2. Данильченко О.П. Чувствительность эмбрионов рыб к действию токсических веществ // Вопр. ихтиологии. 1977. Т. 17. Вып. 3. С. 518-527.

3. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Касьянов А.Н., Папченкова Г.А. Влияние токсических веществ в период эмбриогенеза на выживаемость, линейно-весовые показатели и формирование гонад сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 3. С. 401-409.

4. URL. <http://www.strategy-center.ru/stock/pics/-Ur-prom-Ur-polar>.

5. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В. Аберрантные митозы и гистопатология гонад у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* после токсических воздействий в эм-

бриональный и личиночный периоды развития // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41. № 2. С. 232-238.

6. Селюков А.Г., Ефремова Е.В., Бондаренко Г.Н. Цитоморфологические преобразования первичных половых клеток в эмбриогенезе муксуна *Coregonus muksun* (Pallas) // Вестник ТюмГУ. 2010. № 3. Серия «Медико-биологические науки. Науки о Земле. Химия». С. 45-51.

7. Extavour, C.G.M. Evolution of the bilaterian germ line: lineage origin and modulation of specification mechanisms // Integrative and Comparative Biology, Sympos. «Key Transitions in Animal Evolution». Oxford: Oxford University Press, 2007. P. 1-16.

8. URL. <http://www.cellbiol.ru/book/kletka/yadro/yadryshki>.

9. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М., 1960. 181 с.

10. Реунов А.А., Юрченко О.В., Александрова Я.Н., Исаева В.В. Аутолиз субстанции зародышевой плазмы в сперматогониях морского ежа при воздействии кадмия // Докл. РАН. 2005. Т. 401. № 2. С. 282-285.

11. Au, D.W.T., Reunov, A.A., Wu, R.S.S. Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium II. Effect on sperm development // Environ. Pollution. 2001. Vol. 111. P. 12-20.

12. Au, D.W.T., Yurchenko, O.V., Reunov, A.A. Sublethal effect of phenol on spermatogenesis in sea urchins (*Anthocardaris crassipina*) // Environ. Res. 2003. Vol. 93. P. 92-98.