

УДК 502.175:502.51

*Г. П. Дробот, В. С. Трубачева, О. В. Малюта,
С. Г. Васин, О. И. Павловская*

ГИСТО-МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕЧЕНИ РЫБ КАК БИОИНДИКАТОРЫ КАЧЕСТВА ВОДНОЙ СРЕДЫ

*Морфометрические и гистологические исследования печени карася обыкновенного (*Carassius carassius* L.), обитающего в водоемах Среднего Поволжья, позволили выявить патоморфологические изменения и сдвиги морфометрических параметров этого органа у карася обыкновенного в одном из водоемов, что косвенно свидетельствует о неблагоприятных условиях среды обитания, сложившихся в этом водоеме для данного вида рыб.*

Ключевые слова: биомониторинг, биоиндикация загрязнения, морфология, гистология.

Введение. Неуклонное возрастание антропогенного воздействия на гидросферу приводит к возникновению серьезных отклонений в развитии и функционировании гидробионтов [1, 2]. Для оценки изменений, происходящих в открытых водных экосистемах, не так часто используются рыбы, так как они способны к многокилометровым миграциям и индикация загрязнений по ним достаточно сложна. Анатомические и морфологические характеристики рыб на популяционном и организменном уровнях используются в качестве индикаторов загрязнения закрытых водоемов [1–4]. Данные параметры способны отражать динамику деградации экосистем, поскольку органы рыб характеризуются избирательным накоплением ксенобиотиков, включающихся в биологический круговорот.

При этом загрязняющие экосистемы вещества, как правило, аккумулируются в органах с интенсивными биохимическими процессами – в почках, эндокринных железах, желудочно-кишечном тракте, печени. В настоящее время исследования структурно-функциональных изменений в печени животных приобретают определенное значение для оценки здоровья их среды обитания. К сожалению, таких исследований пока недостаточно, а печень для биоиндикационных исследований привлекается относительно редко [5].

В связи с вышеизложенным **цель** проводимого исследования заключалась в изучении гистологических и морфометрических особенностей печени карася обыкновенного (*Carassius carassius* L.), обитающего в некоторых закрытых водоемах Среднего Поволжья, с разной степенью антропогенной нагрузки и оценке биоиндикаторной ценности анализируемых гисто-морфометрических параметров. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) провести гисто-морфометрическое исследование печени карася обыкновенного;
- 2) провести классификацию особей рыб по комплексу изученных признаков;
- 3) оценить степень изменчивости величин показателей исследуемых структур;
- 4) определяя состояние печени рыб, установить возможное влияние на них среды обитания;
- 5) оценить биоиндикаторную ценность гисто-морфометрических параметров рыб.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служила печень карася обыкновенного (*Carassius carassius* L.), отловленного в водоемах Среднего Поволжья: оз. Паленое (Республика Марий Эл – 5 особей), оз. Дубовое (Республика Мордовия – 3 особи), водоем, прилегающий к с. Тарханы (Пензенская область – 7 особей).

Все пойманные рыбы имели приблизительно одинаковый линейный размер – длину 16 см. Для изготовления гистологических препаратов (парафиновые срезы, 5 мкм) использовали стандартные методики [6]. Для обзорной окраски срезов применяли гематоксилин Караччи и эозин; нейтральные полисахариды выявляли ШИК-реакцией (контроль с α -амилазой) [7]. Для морфометрического анализа печени использовали винтовой окуляр-микрометр МОВ-1-15х ГОСТ 7865-56, с помощью которого определяли диаметры гепатоцитов, их ядер и ядрышек. Замеры проводили на срезах печени каждой особи, морфометрируя по 50 ядер, ядрышек и гепатоцитов. Для подсчета количества митозов (митотический индекс), долей клеток с микроядрами и двуядерных клеток использовали унифицированный метод Фонио [8], учитывая в каждом случае по 1000 клеток у каждого животного. Измеряли площадь паренхимы печени в среднем на одно поле зрения, используя окулярную сетку Автандилова, анализируя 25 полей зрения среза печени для каждого животного [9].

Полученные результаты обрабатывали статистически, определяя различия показателей печени рыб при помощи компьютерной программы Statistica 6.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (модель I). Множественные сравнения средних значений изученных показателей проводили с помощью LSD-теста. Для учета комплекса признаков и распределения исследуемых особей рыб на группы прибегали к многомерной статистике, привлекая метод главных компонент и дискриминантный анализ [10]. Для оценки изменчивости признаков применяли двухфакторный (иерархическая схема, модель II) дисперсионный анализ.

Результаты исследования и обсуждение. Проведенные гистологические исследования печени карася обыкновенного (*Carassius carassius* L.), обитающего в водоемах Дубовое и Тарханы, выявили определенные отклонения в структуре данного органа по сравнению с печенью рыб из оз.Паленое (рис.1).

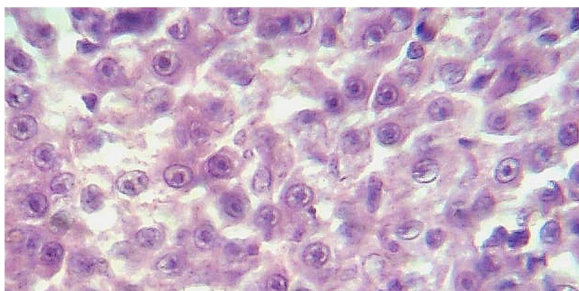


Рис.1. Гепатоциты печени (*Carassius carassius* L.) в норме, оз. Паленое

Так, в печени рыб из оз. Дубовое и пруда Тарханы обнаружены некрозы и дистрофия гепатоцитов (рис. 2, 3); очаги скопления двуядерных клеток; наблюдается снижение количества клеток с гликогеном (ШИК-реакция). В отдельных участках органов отмечается пролиферация купферовских клеток.

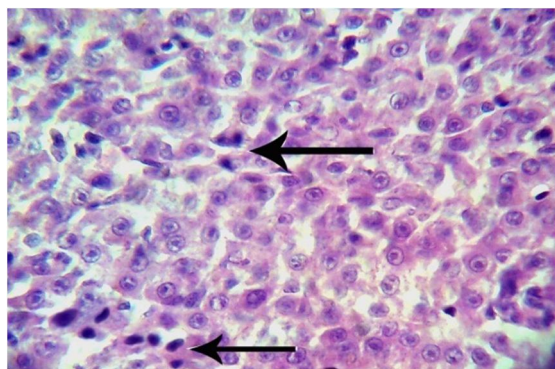


Рис. 2. Очаги некрозов (указаны стрелками) в печени *Carassius carassius* L.

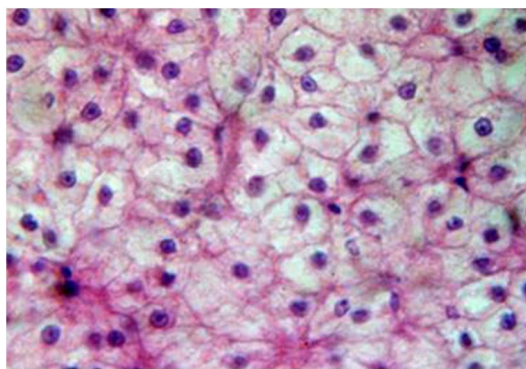


Рис. 3. Очаги вакуольной дистрофии в печени *Carassius carassius* L.

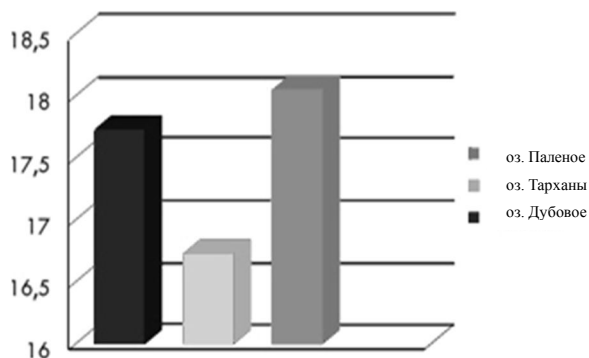


Рис. 4. Величина диаметра гепатоцитов, мкм

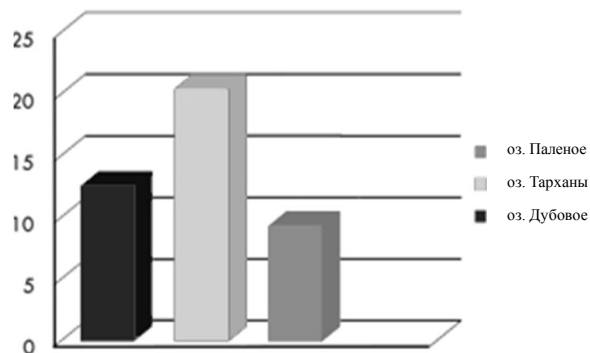


Рис. 5. Доля двуядерных гепатоцитов, %

Обнаруженные нами в печени рыб многочисленные очаги некрозов мы также рассматриваем как патологию. По данным ряда авторов [11,12], некрозы гепатоцитов в печени рыб встречаются довольно часто и являются либо результатом загрязнения вод тяжелыми металлами, либо следствием паразитарных инвазий. На исследованных нами препаратах очаги некротически измененных клеток визуально чаще определялись в печени карася из оз. Тарханы, что косвенно может свидетельствовать о более жестких условиях среды обитания в этом водоеме. В ходе морфометрического анализа установлено, что наименьший диаметр имеют гепатоциты печени рыб из оз. Тарханы (рис. 4).

Наблюдаемая картина уменьшения диаметра клеток печени, по-видимому, является проявлением процессов декомпенсации. Возможно, что среда обитания в водоеме Тарханы неблагоприятно влияет на его гидробионтов, вызывая патоморфологические изменения такого важного органа как печень. В то же время нами установлено статистически значимое увеличение доли двуядерных клеток и размеров площади паренхимы печени рыб, обитающих в водоемах Тарханы и Дубовое, по сравнению с таковыми печени рыб, отловленных в оз. Паленое (рис. 5).

Наблюдаемая дистрофия гепатоцитов – патологический процесс, возникающий, как правило, в связи с нарушениями обмена веществ в клетках и характеризующийся наличием в клетках крупных вакуолей, наполненных цитоплазматической жидкостью (баллонная дистрофия). Данная форма дистрофии является необратимой.

Возможно, что увеличение размеров площади паренхимы печени рыб из этих озер обусловлено общей активацией пролиферативных процессов в данном органе, в том числе – усилением пролиферации купферовских клеток.

Многофакторный анализ с использованием метода главных компонент (табл. 1) выявил наличие четырех главных компонент. С первой главной компонентой положительно скоррелированы диаметр ядер (0,79), диаметр ядрышек (0,88) и отрицательно скоррелирован признак митотический индекс (-0,73). Со второй главной компонентой отрицательно скоррелированы доля двуядерных клеток (-0,69) и площадь паренхимы (-0,69). С третьей главной компонентой положительно скоррелирован размер гепатоцитов (0,72) и отрицательно – доля микроядер (-0,69). С четвертой главной компонентой отрицательно скоррелирован признак «доля ШИК-положительных клеток» (-0,71) и положительно скоррелирован признак «доля двуядерных клеток» (0,56). Доля изменчивости, приходящаяся на первую главную компоненту, составила 27 %, на вторую главную компоненту – 24 %, а на третью и четвертую главные компоненты – 15 и 13 % соответственно. Таким образом, общая доля изменчивости четырех главных компонент составила 79 %.

При сравнении особей рыб в осях главных компонент установлено, что по совокупности признаков рыбы изученных озер не разделились по главным компонентам I, III и IV (рис.6).

Т а б л и ц а 1

Корреляция главных компонент с исходными признаками

Признаки	Главные компоненты			
	1	2	3	4
Диаметр ядер	0,79	-0,31	0,13	-0,26
Диаметр ядрышек	0,88	-0,24	-0,15	-0,23
Диаметр гепатоцитов	0,25	0,51	0,72	0,03
Доля двоядерных гепатоцитов	-0,07	-0,69	-0,11	0,56
Площадь паренхимы	0,02	-0,69	-0,14	-0,01
Доля ШИК-положительных клеток	-0,34	-0,46	0,15	-0,71
Митотический индекс	-0,73	-0,32	0,34	-0,19
Доля клеток с микроядрами	-0,19	0,52	-0,69	-0,31
Абсолютное значение изменчивости	2,15	1,94	1,19	1,08
% изменчивости главных компонент	27,0	24,0	15,0	13,0

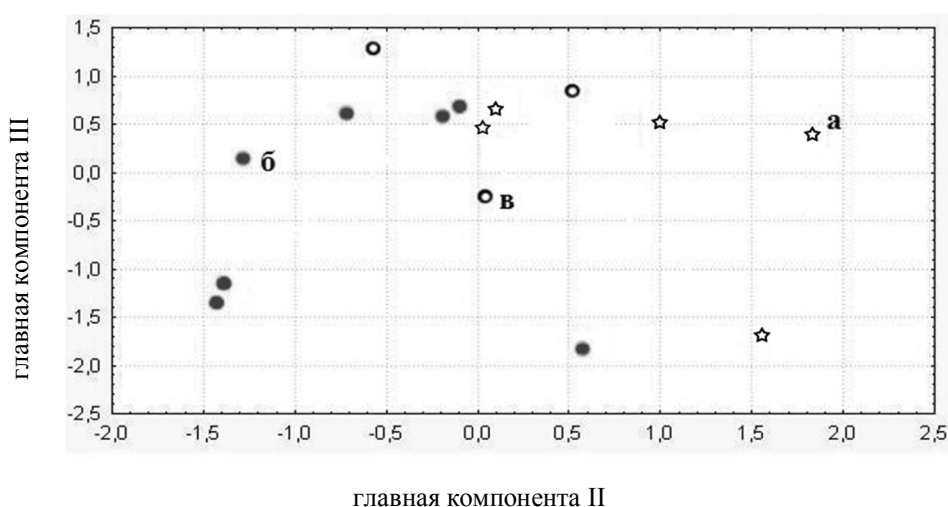


Рис. 6. Положение объектов на осях главных компонент:
а – рыбы из оз. Паленое; *б* – рыбы из водоема Тарханы; *в* – рыбы из оз. Дубовое

В соответствии с рис. 6 наблюдается различие по второй главной компоненте между рыбами из оз. Паленое и Тарханы ($U=2$; $P=0,01$). Рыбы из оз. Дубовое по совокупности признаков занимают промежуточное положение между рыбами двух других озер.

Полученные данные привели к необходимости сравнения параметров второй главной компоненты рыб оз. Паленое (первая выборка) и водоема Тарханы (вторая выборка), выявив между ними значимые различия ($p=0,01$; критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). В дальнейшем для уточнения классификации объектов прибегали к дискриминантному анализу, используя значения II и III главных компонент, и к парному сравнению параметров печени рыб из разных озер (табл. 2, 3; Статистика Уилкса $\lambda = 0,409$; $F(4,22) = 3,1$; $p = 0,037$). Из таблицы видно, что печень рыб из разных озер различается по II главной компоненте ($p = 0,016$).

Т а б л и ц а 2

Оценка значимости главных компонент, выбранных для анализа

Главные компоненты	λ (Уилкс)	λ (частная)	F	P	R ² (объясняющей переменной)
Главная компонента II	0,86	0,47	6,10	0,016	0,039
Главная компонента III	0,49	0,83	1,13	0,358	0,039

В результате парных сравнений параметров печени рыб из разных озер, представленных в табл. 3, статистически значимо различаются только рыбы оз. Паленое и оз. Тарханы ($P=0,012$).

Таблица 3

Результаты парных сравнений показателей печени рыб из разных озер

Озера	Паленое	Тарханы	Дубовое
Паленое		6,108859*	1,938308
Тарханы	6,719745*		2,50795
Дубовое	1,184522	1,724216	

* $P < 0,05$. Ниже главной диагонали приведены значения критерия Фишера, выше главной диагонали – значения расстояния Махаланобиса.

Таким образом, при использовании метода главных компонент и дискриминантного анализа было установлено, что рыбы, обитающие в водоеме Тарханы, по совокупности морфометрических признаков печени составляют отдельную группу и четко отличаются от рыб оз. Паленое. Особи же рыб, отловленные в оз. Дубовое, занимают промежуточное положение. Такая картина, вероятнее всего, связана с недостаточностью выборки, особенно среди рыб оз. Дубовое.

При анализе степени изменчивости величин изученных признаков установлено, что у рыб одного водоема, а также внутри каждой особи рыб отмечаются их высокие уровни соответственно внутривидовой и индивидуальной изменчивости. В то же время изменчивость признаков рыб из разных водоемов минимальна. Эти факты, на наш взгляд, говорят о достаточной пластичности данного органа и его значительных резервных возможностях при повреждениях, подтверждая эволюционное определение печени как системы детоксикации организма [13].

Для определения биоиндикационной ценности гисто-морфометрических параметров печени рыб было проведено исследование физико-химических показателей донных отложений водоемов. В соответствии с табл. 4 и 5 наибольшее содержание техногенных радионуклидов ^{90}Sr и ^{137}Cs обнаружено в донных отложениях озер Дубовое и Тарханы, наименьшее – из оз. Паленое (фоновая территория) [14]. Последующий анализ донных отложений исследуемых озер на содержание тяжелых металлов [15] показал более высокие концентрации ряда (пять – из восьми определяемых) тяжелых металлов (Pb, Zn, Co, Cd, Cr) в образцах из водоема Тарханы. К тому же, значение pH свидетельствует о более кислой реакции среды в данном водоеме.

Таблица 4

Содержание природных и техногенных радионуклидов в донных отложениях озер

Объекты	Удельная активность радионуклидов, Бк/кг					
	Sr 90	K 40 β	K 40 γ	Cs 137	Ra 226	Th 232
оз.Дубовое	16,6±0,62	0	266±3,03	55,7±0,24	10,9±0,27	24,5±0,34
оз.Тарханы	10,2±0,52	592±0,28	497±0,27	32,6±0,13	26,2±0,23	41,4±0,28
оз.Паленое	1,97±0,1	0	35,2±6,9	9,4±0,1	3,7±0,8	3,8±0,5

Таблица 5

Содержание тяжелых металлов в донных отложениях озер

Объекты	pH сол.	Содержание тяжелых металлов, мг/кг							
		Ni	Pb	Zn	Cu	Co	Cd	Cr	Mn
оз.Паленое	6,30	4,55	0,06	152,20	5,70	6,15	1,05	2,50	375,6
оз.Тарханы	5,02	31,90	13,24	196,75	20,45	19,55	1,45	21,75	357,6
оз.Дубовое	5,50	47,65	10,84	84,65	25,45	18,00	1,30	10,75	311,7

Таким образом, по комплексу факторов, гидробиота в водоеме Тарханы, по-видимому, испытывает наибольшую антропогенную нагрузку по сравнению с другими озерами.

Проведенные исследования позволили сделать следующие **выводы**:

1) в паренхиме печени карася обыкновенного (*Carassius Carassius* L.), обитающего в водоемах Дубовое и Тарханы, наблюдаются патологические изменения в виде пикноза ядер, некрозов и дистрофии гепатоцитов;

2) в печени рыб, обитающих в пруду Тарханы, величины диаметра гепатоцитов и доля двуядерных клеток значительно отличаются от величин аналогичных показателей рыб из озер Дубовое и Паленое;

3) изменчивость морфометрических признаков печени между особями карася обыкновенного из водоемов Дубовое, Паленое и Тарханы минимальна, но значительна между особями рыб в каждом из озер по параметрам диаметра ядер и ядрышек (61,2–75,3 %). Для величин диаметра гепатоцитов, долей двуядерных и ШИК-положительных клеток, площади паренхимы печени наибольшая доля изменчивости приходится на неконтролируемую изменчивость в пределах особи (57,4–85,9 %);

4) особи карася обыкновенного из водоема Тарханы отличаются от рыб из озер Дубовое и Паленое по совокупности гисто-морфометрических признаков их печени, что косвенно свидетельствует о более жестких условиях среды обитания в пруду Тарханы;

5) гисто-морфометрические параметры рыб целесообразно использовать для биоиндикации антропогенного загрязнения закрытых водоемов.

Таким образом, рыбы из водоема, испытывающего комплексное антропогенное воздействие, достоверно отличаются по наличию патологий на тканевом уровне.

Выполненные нами исследования указывают на необходимость более детального изучения анализируемых водоемов с увеличением выборки и расширением биоиндикаторов и анализируемых органов, поскольку действие загрязняющих веществ на разные органы и их системы неодинаково, зависит от свойств поллютанта, от функциональных особенностей органов и может характеризоваться видоспецифичностью.

Список литературы

1. Кашулин, Н.А. Рыбы пресных вод субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения / Н.А. Кашулин, А.А. Лукин, П.А. Амундсен. – Апатиты: КНЦ РАН, 1999. – 142 с.
2. Моисеенко, Т.И. Изменение физиологических показателей рыб как индикатор качества вод среды / Т.И. Моисеенко // Мониторинг природной среды Кольского Севера. – Апатиты: КНЦ РАН, 1984. – С. 51-57.
3. Лукьяненко, В.И. Общая ихтиотоксикология / В.И. Лукьяненко. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 320 с.
4. Ашихмина, Т.Я. Биоиндикация и биотестирование: методы познания экологического состояния окружающей среды / Т. Я. Ашихмина. – Киров: ВятГУ, 2005. – Вып. 4. Ч. 3. – 51 с.
5. Трубачева, В.С. Морфология тонкого кишечника и печени щуки обыкновенной из водоемов с различным уровнем загрязненности / В.С. Трубачева, Г.П. Дробот, А.И. Ямбаршева, А.Р. Ахмедшина // 4-е Вавиловские чтения. Диалог науки и практики в поисках новой парадигмы общественного развития России в новом тысячелетии: Материалы постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции. – Йошкар-Ола: МарГТУ, 2000. – Ч. III. – С. 111-112.
6. Меркулов, Г.А. Курс патологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 399 с.
7. Кононский, А.И. Гистохимия / А.И. Кононский. – Киев: Вища школа, 1976. – 280 с.
8. Справочник по клиническим и лабораторным методам исследования / под ред. Е.А. Кост. – М.: Медицина, 1975. – 383 с.
9. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 218 с.
10. Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – СПб.: ВМедА, 2002. – 266 с.
11. Tramp, B.F. Cellular effects of mercury on fish kidney tubules / B.F. Tramp, R.T. Jones, S. Sahaphong // The Pathology of Fishes. – Wash. Univ. Wisconsin Press. – 1975. – P. 585-612.
12. Hibiya, E.T. An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features / E.T. Hibiya. – N.Y.: Kodansha Ltd, 1996. – 147 p.

13. Adams, S.M. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations / S.M. Adams, M. G. Ryon // J. of Aquatic Ecosystem Health. – 1994. – Vol. 3. – P. 15–25.

14. Методика измерения активности радионуклидов в счетных образцах на сцинтилляционном гамма-спектрометре с использованием программного обеспечения «Прогресс». – М.: ВНИИФТРИ, – 1996.–37 с.

15. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельскохозяйственных угодий и продукции растениеводства. – 2-е изд., перераб. и доп./ ЦИНАО.– М., 1992. – 38 с.

Статья поступила в редакцию 16.09.11.

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, ГК № 16. 552.11.7050.

G. P. Drobot, V. S. Trubacheva, O. V. Maluta,
S. G. Vasin, O. I. Pavlovskaya

HISTO-MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF FISH LIVER AS BIOINDICATORS OF WATER ENVIRONMENT QUALITY

Morphometric and histological studies of the liver of an ordinary carp (Carassius carassius L.), inhabiting the ponds of the Middle Volga, allowed to identify pathomorphological changes and changes in morphometric parameters of the organ of an ordinary carp inhabiting one of the ponds. This is an indirect evidence of difficult environmental conditions of habitation in the pond for this fish species.

Key words: biomonitoring, bioindication of pollution, morphology, histology.

ДРОБОТ Галина Павловна – кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой биохимии и физиологии биолого-химического факультета Марийского государственного университета. Область научных интересов – эмбриология, гистология, биомониторинг. Автор 97 публикаций.

E-mail: droga59@mail.ru

ТРУБАЧЕВА Вера Сергеевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и физиологии биолого-химического факультета Марийского государственного университета. Область научных интересов – эмбриология, гистология, биомониторинг, физиология. Автор 127 публикаций.

E-mail: vera.trubachova@gmail.com

МАЛЮТА Ольга Васильевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии, почвоведения и природопользования МарГТУ. Область научных интересов – экологический мониторинг, биоиндикация, биотестирование, радиоэкология. Автор 63 публикаций.

E-mail: olgamal@list.ru

ВАСИН Сергей Геннадьевич – аспирант кафедры лесных культур и механизации лесохозяйственных работ МарГТУ. Область научных интересов – радиоэкология. Автор 10 публикаций.

E-mail: vasinsg@mail.ru

ПАВЛОВСКАЯ Ольга Игоревна – студентка Марийского государственного университета. Область научных интересов – эмбриология, гистология. Автор одной публикации.

E-mail: o_ji_e_h_b_k_a@inbox.ru