

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра генетики

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ РЕЧНОГО ОКУНЯ
(*PERCA FLUVIATILIS*) ИЗ ВОДОЕМА – ОХЛАДИТЕЛЯ
БАЛАКОВСКОЙ АЭС**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Тилевой Кристины Дмитриевны

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук

03.06.19



А.С. Кашин

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук

03.06.19



О.И. Юдакова

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Атомные электростанции (АЭС) наряду с другими промышленными объектами могут являться источниками техногенного загрязнения окружающей природной среды. В связи с этим в районах расположения атомных станций создаются системы контроля над состоянием окружающей среды с целью обеспечения надзора за безопасностью ее работы. Эти системы должны обеспечивать охрану здоровья персонала, населения, а также контролировать выполнение природоохранного законодательства в периоды строительства, эксплуатации и снятия с эксплуатации объектов атомной энергетики, как в нормальном, так и в аварийном режимах, т.е. обеспечивать сохранение экологически допустимых уровней загрязнения, гарантирующих безопасность персонала, населения и окружающей среды [1].

Влияние атомных электростанций на окружающую природную среду многогранно и имеет множество аспектов. Одним таким аспектом является необходимость использования больших объемов воды, охлаждающих конденсаторы турбины. Создаются водоемы-охладители или используются естественные водоемы, строятся градирни и другие системы охлаждения. Влияние объектов атомной энергетики на экосистемы близлежащих водоемов и водотоков также остается актуальным. Забор воды из природных водоемов вместе с организмами и сброс технических вод, участвующих в технологическом цикле, эксплуатируемой АЭС, оказывают значимое потенциально-техногенное воздействие. В результате неизбежно оказывается негативное воздействие на жизнедеятельность фитопланктона, зоопланктона, зообентоса и ихтиофауны. Данная проблема решается в процессе оценки воздействия на окружающую среду [2].

Одним из способов оценки влияния АЭС на ихтиофауну является анализ показателей крови рыб, поскольку известно, что любые функциональные расстройства органов приводят к сдвигам в показателях гомеостаза. Известно, что рыбы очень чувствительны к содержанию в воде

химических агентов и отвечают на их присутствие изменениями, даже если их концентрация не превышает ПДК [3], тем более что действие различных токсикантов может суммироваться и усиливаться (аддитивный и синергический эффект). Хроническое воздействие неблагоприятных факторов на организм приводит к нарушению цитогенетической стабильности и накоплению хромосомных аномалий в клетках организма. Кроветворная система рыб чутко реагирует на изменение факторов водной среды. При патологических состояниях в крови рыб регистрируются морфологически измененные клеточные элементы, клетки с различной степенью деструкции [4].

Цели и задачи исследования. Цель данной работы состояла в оценке влияния Балаковской АЭС на кровь речного окуня (*Perca fluviatilis*).

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Провести сравнение количества клеток с микроядрами в крови окуней из водоема-охладителя Балаковской АЭС и контрольного водоема.
2. Сравнить суммарное количество клеток крови с цитопатологическими нарушениями у окуней из водоема-охладителя Балаковской АЭС и контрольного водоема.
3. Проанализировать многолетнюю изменчивость показателей крови окуней на основании собственных данных и ранее проведенных исследований.

Материалы исследований. Объектом изучения являлись представители ихтиофауны, наиболее широко распространенные в водоеме-охладителе Балаковской АЭС – речной окунь (*Perca fluviatilis*).

Структура работы. Диплом изложен на 53 страницах и содержит такие структурные элементы: Содержание, Введение, Основная часть, Выводы и Список использованных источников. В свою очередь основная часть содержит такие главы: Обзор литературы, материал и методы, результаты исследования и обобщение результатов многолетнего

мониторинга. В работе имеется 17 рисунков, 2 таблицы, 7 гистограмм. Список литературы содержит 75 источников из них 3 на английском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается актуальность исследования, отмечается практическая и теоретическая значимость работы, формулируются основные цель и задачи исследования.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Изучены принципы организации и работы АЭС. Проведен анализ литературы по воздействию тепловых и атомных электростанций на водоемы – охладители. Обзор методов изучения форменных элементов крови рыб. Рассмотрены форменные элементы рыб и их мутации. Показана возможность использования экологического мониторинга водоемов с применением цитогенетических показателей крови рыб.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кровь, лабильная ткань, быстро реагирующая на воздействие внешних или внутренних факторов и приводит к восстановлению баланса между организмом и средой. При ранней диагностики заболевания важное значение имеет анализ крови. Поэтому, контроль за физиологическим состоянием рыб, производится с помощью наблюдений за изменением морфологического состава крови, что крайне важно при ихтиологических, ихтиопатологических и других исследований [5].

Микроскопические исследования форменных элементов крови рыб, проводятся на окрашенных препаратах с применением иммерсионного объектива, следовательно, успех работы зависит от качества приготовленных препаратов, на сколько они удачно зафиксированы и окрашены. Поэтому,

предметные стекла, используемые для приготовления мазка, тщательно обрабатываются и готовятся заранее.

Для изготовления тонкого мазка крови на край предметного стекла наносят небольшую каплю крови, перед которой ставится под углом 45 градусов другое более узкое отшлифованное стекло, которое отодвигают назад до соединения с каплей крови, так чтобы она растеклась между краем шлифованного и поверхностью предметного стекла. Затем медленным движением производят мазок. Считают, что при правильном изготовлении препарата мазок должен заканчиваться, не достигая 1,5 – 2 см до края стекла. Препараты высушивают на воздухе, после производят фиксацию и окраску препаратов.

Подписанные мазки крови ставят в специальные штативы для просушки, после чего производят фиксацию и окрашивание. В качестве фиксаторов используют жидкости типа Май-Грюнвальд, Лейшман и др. Хорошо просушенные препараты попарно мазками наружу ставят на узкое ребро стекла небольшой прямоугольной, иногда округлой сосуд или специальные стаканчики и заливают готовым неразведенным фиксатором. Через 3-5 мин. препараты освобождают от фиксатора и споласкивают дистиллированной водой. После этой операции производят докраску азурэозином по Романовскому-Гимза. При массовой окраске препаратов используют большие кюветы.

Окраску, как и фиксацию препаратов, следует производить сразу после изготовления и просушки мазка. Готовый краситель азурэозин, по Романовскому, предварительно разбавляют дистиллированной водой из расчета одна капля красителя на 1 мл дистиллированной воды. Время окраски 20–30 мин. После окраски препараты хорошо прополаскивают сначала дистиллированной, а затем простой водой и снова ставят в штативы для просушки. Рабочий раствор красителя готовят непосредственно перед употреблением.

Для выявления зернистости на ранних стадиях развития гранулоцитов пользуются особой окраской – пероксидазной реакцией, по методу Сато и Секиа или по Грехему и Кнолю. В последнем случае лимфоциты не окрашиваются. Моноциты дают слабую положительную реакцию. С помощью этой реакции отличают молодые формы гранулоцитов от молодых форм лимфоцитов, а также взрослых лейкоцитов.

Хранят препараты в темном месте. Подсчет количества эритроцитов проводился с помощью камеры Горяева. Для выражения степени насыщенности эритроцитов гемоглобином вычисляли содержание гемоглобина в одном эритроците (СГЭ) в пг [10]. Лейкоцитарная формула крови определялась на окрашенных препаратах при использовании светового микроскопа (*Olympus*) при увеличении 10×100 . На мазках подсчитывали 200 лейкоцитов по общепринятой методике. Общее число лейкоцитов учитывали косвенным методом. Определяли число лейкоцитов, встречающихся при подсчете на 1000 эритроцитов в мазке крови и пересчитывали их количество на 1 мкл по формуле: $X = (A * B) / 1000$, где X – общее количество лейкоцитов в 1 мкл крови, A – число эритроцитов в 1 мкл крови, определенное в камере Горяева, B – число лейкоцитов, определенное при подсчете 1000 эритроцитов на мазке крови.

Патоморфологические нарушения структуры ядра определяют согласно рекомендациям [11]. На препаратах проводился учет эритроцитов с микроядрами и другими фенотипическими отклонениями от нормальной конфигурации интерфазного ядра. Микроядра представляют собой сферические цитоплазматические включения хроматина, имеющие четкий контур. Диаметр МЯ варьирует от одной десятой до одной трети диаметра ядра. Микроядра «похожи» на ядро по структуре и окраске. Микроядра не связаны с ядром.

Долю клеток с микроядрами (МЯ %) определяют отношением количества клеток с микроядрами к общему количеству проанализированных

эритроцитов. Аналогично оценивали долю клеток с другими типами патологии ядра [12].

Отлов рыбы проводился 21 – 23 сентября 2018 г. Объектом изучения являлись представители ихтиофауны, наиболее широко распространенные в водоеме-охладителе Балаковской АЭС – речной окунь (*Perca fluviatilis*). Рыба отлавливалась в водоеме-охладителе Балаковской АЭС. Выборка составила двенадцать особей. В качестве контрольной выборки (10 особей) использовались особи, пойманные в устье реки Малый Иргиз. По чешуе определялся возраст рыбы. При вскрытии определялась зараженность нематодой.

В процессе исследования анализу подвергались эритроциты периферической крови полученные прижизненно из хвостовой вены. Фиксация препарата производилась этиловым спиртом, а также простым высушиванием на воздухе с последующим хранением препарата при температуре 2–3 °С. Окрашивание препарата производилось акридиновым оранжевым в течение 20 минут. Подготовленные описанным образом мазки просматривались на микроскопе Микмед-2 в ультрафиолетовом свете с увеличением 100×1,5×10. На препарате подсчитывались клетки с микроядрами, а также отмечались клетки с цитогенетическими повреждениями, анализу подвергались более 2000 клеток. Микроядра идентифицировались как округлые образования, имеющие свечение зелёным или красным цветом, находящиеся непосредственно рядом с ядром в одной оптической плоскости. Проверка нормальности распределения проводилась графически и по критериям Колмогорова – Смирнова, Шапиро – Уилкса W и критерию Лиллиефорса. Рассчитывались асимметрия и эксцесс. Оценка достоверности различий между выборками проводилась по критерию Манна – Уитни.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате анализа периферической крови окуней, выловленных из р. Малый Иргиз (контроль) было отмечено, что микроядра встречаются лишь в единичных клетках. Медиана выборки равна 1. У особей из водоема-охладителя БАЭС количество клеток с микроядрами колеблется в пределах 0 – 2 (на 2000 клеток), медиана составляет 1 на две тысячи просмотренных эритроцитов.

Помимо клеток с микроядрами, как в водоеме-охладителе, так и контроле были выявлены другие цитогенетические нарушения. Так, на просмотренных препаратах были обнаружены деструктивные изменения ядра, вызванные, в частности, нарушением целостностью кариолеммы, в результате чего происходит выход содержимого ядра (хроматина) в цитоплазму, проявляющиеся в образовании так называемых «хвостов» (рисунок 17). Помимо того, были выявлены такие цитологические патологии как ядра с насечкой, протрузии, ядра неправильной формы.

При статистическом анализе результатов исследования использовали непараметрическую статистику, поскольку значения количества клеток с микроядрами были распределены ненормально. Кроме этого количество клеток с микроядрами величина, которая варьирует дискретно и не образует сплошного вариационного ряда, для анализа таких переменных рекомендуется использовать непараметрическую статистику. Между количеством клеток с микроядрами в крови окуней отловленных из водоема-охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз статистически достоверных отличий отмечено не было ($U = 48,5$; $p = 0,468$).

Суммарное количество клеток со всеми зарегистрированными цитогенетическими нарушениями у особей из водоема-охладителя составило 6,67 – 23 (медиана 12). У окуней из р. М. Иргиз этот параметр составил 5–12 (медиана 10). Между суммарным количеством клеток с цитопатологическими нарушениями в крови окуней отловленных из

водоема-охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз статистически достоверных отличий не отмечено ($U = 36,5$; $p = 0,129$).

Глава 4. ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МНОГОЛЕТНЕГО БИОМОНИТОРИНГА

Сравнивая полученные данные с результатами предыдущих лет (таблица 2) исследования можно отметить, что в 2013 году количество клеток с микроядрами было больше, чем в 2014 году. Данные 2016 года в целом соответствуют данным 2015 года. В 2017 г. количество цитопатологических нарушений крови рыб несколько снизилось. В 2018 показатели крови не претерпели изменений по сравнению с 2017 г. Это можно объяснить влиянием сезонного и температурного факторов на гематологические показатели рыб. Отлов рыб в 2013 г. проводился в конце августа, а в 2014, 2015 и 2016 гг. немного раньше, в середине месяца. В 2017 и 2018 гг. в сентябре.

Таблица 2 – Значение медиан численности клеток с микроядрами и суммарным количеством цитопатологических нарушений на 2000 просмотренных клеток за период исследования охладителя Балаковской АЭС и контрольном водоеме (р. Малый Иргиз) на 2000 просмотренных клеток

год	медиана количества клеток с микроядрами		медиана суммарного количества клеток с цитопатологическими нарушениями	
	в.-о.	контроль	в.-о.	контроль
2014	1	0	10,5	8,5
2015	4,5	1	12	4,5
2016	3	2	18,5	7
июн.17	1,33	1,67	6,83	12,67
сен.17	1	1,33	12	10,67
2018	1	1	12	10

Существуют исследования, показывающие, что частота встречаемости эритроцитов рыб с микроядрами достоверно выше в летний период исследования, что возможно связано с перестройкой метаболизма у рыб, а также с увеличением выбросов загрязняющих веществ во время весеннего паводка [13].

По данным исследований, проведенных в 2013 г. статистически достоверных отличий количества клеток с микроядрами в крови окуней из водоема-охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз обнаружено, не было. В 2014 и 2015 гг. выявлены достоверные отличия по данному показателю по сравнению с контролем. Это может быть вызвано более высокой температурой в водоеме-охладителе БАЭС. Кроме этого, почти все окуни отловленные в 2015 г. были заражены нематодой *Eustrongylides* sp. (NEMATODA: DIOSTORHYMIDAE). Заражение паразитарными инвазиями может повлиять на состояние крови рыб [14,15], что и могло вызвать повышение количества микроядер в крови и определить статистически достоверные отличия между выборками из р. Малый Иргиз и водоема-охладителя Балаковской АЭС. По данным исследований 2017 г. и 2016 г. статистически достоверных отличий количества микроядер в крови окуней из водоема-охладителя Балаковской АЭС и устья р. Малый Иргиз не обнаружено.

В 2018 г. для исследования отбирались только окуни не зараженные нематодами. При сравнении здоровых окуней из водоема-охладителя и контроля достоверных отличий количества микроядер и иных патологий крови обнаружено не было.

ВЫВОДЫ

1. В результате анализа периферической крови окуней, выловленных из р. Малый Иргиз (контроль) было отмечено, что микроядра встречаются лишь в единичных клетках. Медиана выборки равна 1. У особей из водоема-охладителя БАЭС количество клеток с микроядрами колеблется в пределах 0 – 2 (на 2000 клеток), медиана составляет 1 на две тысячи просмотренных эритроцитов. Между количеством клеток с микроядрами в крови окуней отловленных из водоема-охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз статистически достоверных отличий отмечено не было ($U=48,5$; $p=0,468$).

2. Между суммарным количеством клеток с цитопатологическими нарушениями в крови окуней отловленных из водоема-охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз статистически достоверных отличий не отмечено ($U=36,5$; $p=0,129$). Суммарное количество клеток со всеми зарегистрированными цитогенетическими нарушениями у особей из водоема-охладителя составило 6,67 – 23 (медиана 12). У окуней из р. М. Иргиз этот параметр составил 5–12 (медиана 10).

3. Показатели крови окуня в 2018 году не потерпели изменений. Достоверных отличий количества клеток с микроядрами ($Z=1,21$; $p=0,22$) и суммарного количества клеток с цитопатологическими нарушениями ($Z=1,36$; $p=0,17$) по результатам исследования на протяжении 8 лет не обнаружено, что говорит об отсутствии негативных цитопатологических факторов для окуней в водоеме-охладителе БАЭС по сравнению с контролем (р. М. Иргиз).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кошелев, Ф. П. Технологии ЯТЦ и экология: Учебное пособие / Ф.П. Кошелев, М. Е. Силаев, О. В. Селиваникова // Томск: Изд-во ТПУ, 2008. – 208 с.
2. Лунева, Е. В. Оценка влияния атомных электростанций России на Экосистемы Водоемов-Охладителей // Научный журнал «Известия КГТУ», №34, 2014 г. – С. 20.
3. Житенева, Л. Д. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник / Л. Д. Житенева, О. А. Рудницкая, Т. И. Калюжная. Ростов-на-Дону: Молот, 1997. - 134 с.
4. Минеев, А. К. Нарушения морфологии клеток крови у молоди карповых рыб Саратовского водохранилища / А. К. Минеев // Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти, 2008. - 110 с.
5. Кудрявцев, А. А. Гематология животных и рыб / А. А. Кудрявцев, Л. А. Кудрявцева, Т. И. Привольное. М.: Колос, 1969. - 320 с.
6. Ромейс, Б. Микроскопическая техника / Ромейс Б. Перевод с немецкого В. Я. Александрова, З. И. Крюкова. М.: Иностранная литература, 1953. - 575 с.
7. Роскин, Г. И. Микроскопическая техника / Г. И. Роскин, Л. Б. Левинсон. М.: Советская наука, 1957. - 468 с.
8. Иванова, Н. Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб) / Н. Т. Иванова. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. - 65 с.
9. Житенева, Л. Д. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб / Л. Д. Житенева, Т. Г. Полтавцева, О. А. Рудницкая. Ростов-на-Дону: Кн. изд-во, 1989. - 149 с.
10. Кузина, Т. В. Цитофизиологические особенности крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала: автореф. дис. Т. В.Кузина канд. биол. наук / Т. В. Кузина. Астрахань, 2011. - 22 с.

11. Головина, Н. А. Морфофункциональная характеристика крови рыб – объектов аквакультуры: автореф. дис. докт. биол. наук. М.: Всерос. НИИ пруд. рыб. хоз-ва, 1996. - 53 с.
12. Кузина, Т. В. Цитофизиологические особенности крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала: автореф. дис. Т. В. Кузина канд. биол. наук / Т. В. Кузина. Астрахань, 2011. - 22 с.
13. Кузина, Т. В. Анализ патологических форм эритроцитов крови судака (*Stizostedion luciperca*) Волго-Каспийского канала // Материалы 1-ой международной телеконференции «Фундаментальные медико-биологические науки и практическое здравоохранение». Томск, 2010. - С. 105-107.
14. Анохина, В. С. Характеристика крови и гистология половых желез заводского и дикого гольца озерного / В. С. Анохина, А. Н. Квасоварова, К. С. Щербак // Вестник МГТУ. 2012. Т.15. №4. - С. 691-700.
15. Завьялов, А. В. Влияние зараженности нематодой *Hysterothylacium aduncum* на активность антиоксидантных ферментов мерланга *Merlangius merlangus euxinus* / А. В. Завьялов, Е. Н. Скуратовская // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Мат. III Междунар. конф. Петрозаводск, 2010. - С. 62-63.

