

Каниева Н.А.

Астраханский государственный технический университет

ТЕСТ-ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ НЕФТИ НА РЫБ ПО МОРФОСТРУКТУРНОМУ АНАЛИЗУ КРОВИ

В работе представлены результаты исследований влияния нефти на функциональные и структурные изменения сыворотки крови карповых рыб. Выявлена зависимость между данными биохимического и структурного методов исследования, что позволяет предложить определение качественного и количественного состава морфотипов сыворотки крови посредством поляризационно-оптической микроскопии в качестве предварительного теста оценки действия нефти.

Известно, что морфология текстур, формирующихся при фазовых переходах биологических жидкостей в процессе высушивания, отражает состояние организма и изменяется при развитии патологических процессов. Эти изменения характеризуют химические сдвиги, связанные с нарушением нейрогуморальной регуляции и функции органов и систем. В связи с этим морфотесты в последнее время достаточно широко используются в медицине для динамической оценки состояния организма при воздействии эндо- и экзогенных факторов среды (Шабалин, Шатохина, 2001).

Существует мнение, что живая клетка – это по существу жидкий кристалл, молекулы которого «образуют идеальную среду для каталитического действия, в частности, действия сложного типа, способного обеспечить рост и воспроизведение» (цит. по Берналу Дж., 1969).

Нормальным состоянием липидного биослоя мембраны живой клетки является динамический переход «гель – жидкий кристалл», что обеспечивает избирательную проницаемость мембран, транспорт через нее ионов и молекул, т. е. данные структурные переходы служат пусковым механизмом при переключении клетки из одного метаболического состояния в другое.

Установлено, что для биологических систем наибольшее значение имеют липотропные жидкие кристаллы (амфифильные вещества), необходимые для обеспечения нормального протекания метаболических процессов (Де Же В., 1982; Браун Г., Уолкен Дж., 1982).

Жидкокристаллический способ организации является характерным и для цитоплазмы, движение которой зависит от разнообразных переходов в сложной системе «липид – белок – вода» (Минц, Кононенко, 1981, Альбертс и соавт., 1986, Шабалин, Шатохина, 2001).

По данным, приведенным в работе Р.И. Минца и Е.В. Кононенко (1981), в условиях функционирования в организме жидкокристаллическую структуру обладают липиды, производные стероидов, белки, нуклеиновые кислоты и сложные системы этих биополимеров в воде. Для обра-

зовавшихся в биологической жидкости молекулярных агрегатов свойственны двулучепреломление и оптическая активность.

Сложную жидкокристаллическую систему представляет собой нервная ткань, в частности, мозг, серое вещество которого состоит из липидов (цереброзидов, глицеридов, фосфатидов), обладающих мезоморфными свойствами (Чистяков И.Г. с соавт., 1976).

Известно, что при некоторых патологических состояниях жидкие кристаллы накапливаются в тканях вне связей с биоструктурами, угнетая при этом обменные процессы (Чистяков И.Г. с соавт., 1976; Минц Р.И., Кононенко Е.В., 1981).

Любая биосреда по мере высыхания претерпевает следующие фазовые переходы: молекулярный раствор – мицеллярный раствор – жидкокристаллическая фаза – твердокристаллическая фаза. При этом молекулярные комплексы формируют либо кристаллические структуры, либо концентрационную волну в зависимости от условий дегидратации. Установлено, что способность биожидкостей к кристаллизации во многом зависит от характера окружающей среды. При изменении ее вязкости и соотношения основных компонентов, появлении в ней продуктов незавершенного метаболизма, элементов разрушения тканей и других патологических образований создаются условия для формирования «аномальных» кристаллов.

Изучение «жидкокристаллических» текстур является одним из широко развивающихся направлений в кристаллизационной диагностике биожидкостей. Данные исследования имеют несколько аспектов: 1) устанавливается взаимосвязь морфоструктурных особенностей биожидкостей с развитием патологических процессов в организме; 2) проводится изучение влияния экзогенных факторов на формирование жидкокристаллических и кристаллических текстур в биожидкости.

Информационными критериями служат морфотипы, количество образующихся кристаллов, их распределение по размерам, цветности, а также площадь кристаллообразования и

другие параметры, оцениваемые с помощью поляризационно-оптических и поляризационно-фотометрических методов.

Согласно классификации В.Н. Шабалина и С.Н. Шатохиной, существуют две основные группы кристаллов: базисные (нитевидные, крупные, средние сферолиты), встречающиеся преимущественно у здоровых лиц, и «патологические». Формирование патологических морфотипов может идти по трем направлениям: возникновение вторичных форм, состояния аморфности или появление атипичных формобразующих структур. Наличие вторичных форм кристаллов указывает на процессы адаптации организма к изменившимся условиям существования. Появление атипичных форм, отличных по величине, форме, яркости и цвету, а также состояние аморфности свидетельствуют о напряжении и выраженном нарушении со стороны механизмов поддержания гомеостаза.

Таким образом, жидкокристаллические структуры активно участвуют в обеспечении сложных функций многих биологических систем, а также в развитии различных патологических состояний. Процессы кристаллизации представляют собой неспецифический механизм в обеспечении приспособительных реакций при взаимодействии живых организмов с окружающей средой.

В физиологии использование кристаллизационных проб в качестве индикаторов позволяет фиксировать изменения структуры биожидкостей для определения на молекулярном уровне патогенного действия факторов окружающей среды как *in vivo*, так и *in vitro* и тестов на загрязнение внутренней среды организма; определение эндотоксинов, мутагенов и болезнетворных микроорганизмов. Принимая во внимание информационное значение структур твердой фазы биологических жидкостей, мы впервые провели морфологический анализ текстур сыворотки крови рыб в аналитической ячейке методом поляризационной микроскопии.

Целью наших исследований явилось изучение морфологической картины сыворотки крови и проницаемости гистогематических барьеров внутренних органов для оценки физиологического состояния двухлеток карпа в зависимости от времени действия сублетальной концентрации нефти.

Материалы и методы исследований

Объектом исследований были выбраны двухлетки карпа (*Cyprinus carpio L.*) В подострых опытах использовали сублетальную концентрацию

нефти – 150 мг/л, которая была установлена из результатов острого влияния (ЛК0 = 150 мг/л). Контрольных рыб содержали в воде без добавления токсиканта. Эксперимент проводили при постоянной аэрации воды и кормлении живыми и искусственными кормами. Пробы крови отбирали из хвостовой вены рыб через 10, 20 и 30 суток эксперимента, у интактных – автоконтролем.

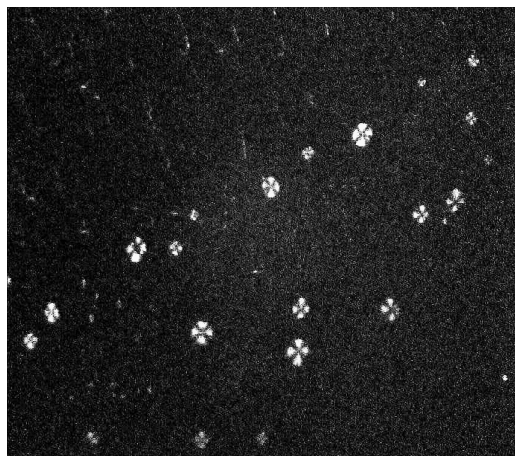
Изучение структур твердой фазы сыворотки крови проводили методом краевой дегидратации. Наблюдаемые текстурные оценивали согласно классификации В.Н. Шабалина и С.Н. Шатохиной (2001).

Выявление образованных анизотропных структур осуществляли с использованием стереомикроскопа фирмы «Leica – MZ 12,5», оснащенного поляризационной насадкой и телевизионной камерой «Рисхера». Морфологическое исследование биологических жидкостей проводилось на базе патоморфологической лаборатории ГУ НИИ по изучению лепры Минздрава РФ. Проницаемость гистогематического (ГГБ) и гематоэнцефалического барьеров (ГЭБ) определяли *in vitro* колориметрическим методом (Справочник «Биохимические методы исследования в клинике», 1969).

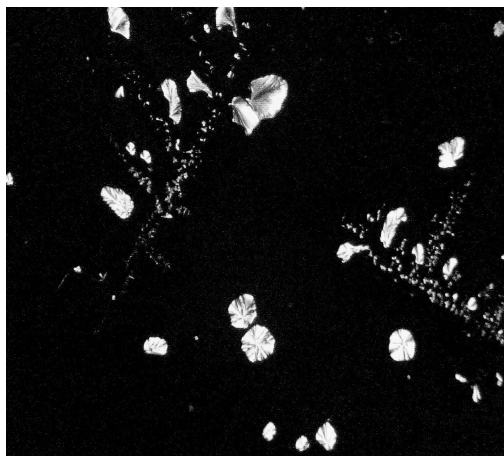
Результаты исследований и их обсуждение

Результаты анализа структурных образований сыворотки крови показали, что в ранние сроки влияния нефти наиболее информативным является метод поляризационной микроскопии. При просмотре в поляризованном свете оптических ячеек, приготовленных из сыворотки крови рыб контрольной группы, было обнаружено преимущественное содержание базисных форм кристаллов в виде сферолитов, на фоне которых регистрировалось незначительное количество вторичных текстур (рис. 1а; табл. 1). В сыворотке крови рыб через 10 суток эксперимента отмечалось увеличение по сравнению с контролем содержания вторичных дендритных и мелких полиморфных морфотипов почти в 5 раз (рис. 1б; табл. 1) при одновременном уменьшении числа базисных в 3,2 раза, что связывают с напряженностью механизмов адаптации (Минц, 1984; Шибалин с соавт. 1997; 2000). Влияние нефти в течение 20-30 суток привело к увеличению вторичных морфотипов в 4,1 и 4,5 раза и появлению атипичных цветных кристаллов в сыворотке крови рыб в 21,4 и 23,6 раза соответственно, относительно контрольных (рис. 1в, г; таб. 1).

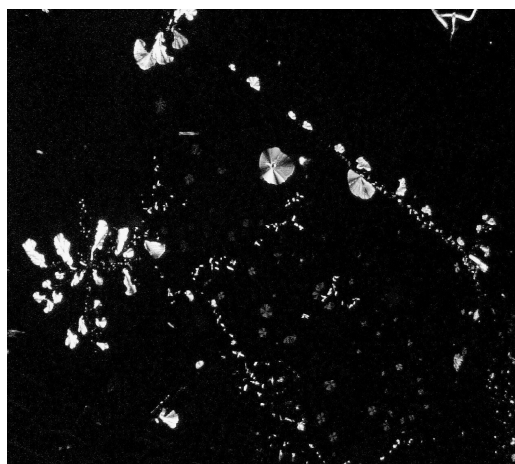
Для нормального функционирования клеток, тканей и органов необходимо постоянное поступление в них веществ из крови и выведе-



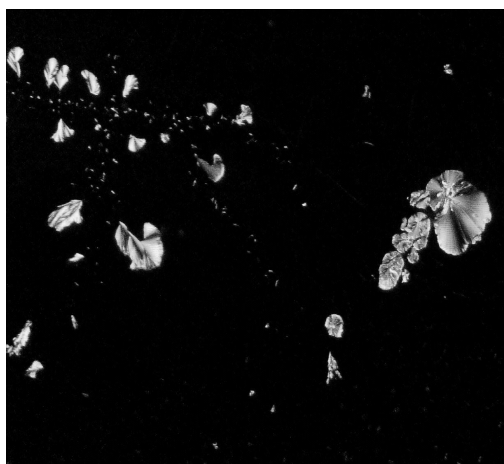
а – контроль



б – 10 суток эксперимента



в – 20 суток эксперимента



г – 30 суток эксперимента

Рисунок 1. Морфотипы сыворотки крови карпа, ув. 50

ние продуктов метаболизма. Эти процессы ограничиваются и регулируются целым комплексом структур, образующих своего рода барьер между кровью и тканью (ГГБ). Основным свойством ГГБ является проницаемость (Касиль, 1963; 1978).

Исследования гистогематических барьеров непосредственно помогают понять возможности и ответные реакции организма во взаимодействии с внешней средой, при естественном и экспериментальном проникновении различных поллютантов (Росин, 1981).

Результаты наших исследований показали, что изменения морфоструктур в виде появления атипичных кристаллов в сыворотке крови подопытных рыб отразились на проницаемости гистогематических барьеров (ГГБ) внутренних органов (табл. 2).

Значения проницаемости анализируемых структур в контрольной группе распределялись в порядке возрастания: мозг, печень, мышцы. Воздействие нефти значительно изме-

нило проницаемость. На 10-е сутки эксперимента выявлено достоверное возрастание проницаемости в мозге и незначительное возрастание в мышцах. В печени отмечен обратный процесс – понижение рассматриваемого показателя. В данной экспозиции произошло перераспределение значений проницаемости анализируемых органов и тканей в порядке возрастания; печень, мышцы, мозг. С увеличением времени воздействия нефти (20 суток) в мозге рыб выявлено существенное приближение протекания изучаемого процесса к уровню, близкому к контрольному. Проницаемость ГГБ мышц к нейтральному красному продолжала достоверно возрастать. В печени воздействие нефти значительно изменило проницаемость ГГБ почти в 1,5 раза относительно контроля. Значения проницаемости анализируемых структур в данной экспозиции также подверглись перераспределению в порядке возрастания: мозг, мышцы, печень. На 30-е сутки влияния нефти на рыб выявлено достоверное

Таблица 1. Характеристика распределения текстур сыворотки крови двухлеток карпа при интоксикации нефтью

Экспозиция, сутки	Морфотипы сыворотки крови, %		
	Базисные	Вторичные	Атипичные
Контроль	85,713	14,287	0,0
10	26,426	71,426	2,149
20	19,287	59,287	21,426
30	12,149	64,287	23,574

Таблица 2. Анализ проницаемости ГГБ и ГЭБ некоторых органов и тканей двухлеток карпа при интоксикации нефтью в эксперименте

Органы и ткани	Экспозиция, сутки	M±m
Мышцы	Контроль	2359,8±48,3062
	10	2542,7±145,3031
	20	2681,4±101,1812*
	30	2680,2±104,8646*
Печень	Контроль	2057,7±115,0087
	10	1875,4±194,8532
	20	3073,6±70,4221 *
	30	2163,3±180,0698
Мозг	Контроль	1661,3±131,0581
	10	3113,4±46,9682 *
	20	1845,9±50,1765
	30	3276,5±61,0411 *

Примечание. Звездочками отмечены величины достоверно отличающиеся от соответствующих значений в контроле: * p ≤ 0,05

возрастание проницаемости в мышцах и мозге (в 1,1-1,9 раза). В печени зафиксирована динамика приближения экспериментальных данных к контрольному уровню. Перераспределение значений проницаемости анализируемых структур (печень, мышцы, мозг) в последней экспозиции совпадало с 10-суточной экспозицией нашего эксперимента. Воздействие нефти на ГГБ и ГЭБ анализируемых органов

и тканей имело, безусловно, выраженный характер. Выявлено несомненное увеличение барьерной проницаемости для мышц по мере возрастания времени токсического влияния нефтяной среды. В печени и мозге значения проницаемости имели разнонаправленный характер в зависимости от экспозиции. Причем проницаемость ГГБ печени была особенно высока на 20-е сутки, а ГЭБ на 10-е и 30-ые сутки эксперимента. Также следует отметить, что на 30-е сутки результаты проницаемости ГГБ и ГЭБ были выше по сравнению с контрольными.

Проведенный анализ проницаемости ГГБ и ГЭБ разных органов и тканей двухлеток карпа показал на реальные изменения функциональных особенностей проницаемости клеточных структур в условиях экспериментальных неблагоприятных воздействий.

Таким образом, изучение морфологического анализа сыворотки крови и проницаемости гистогематических барьеров внутренних органов может служить для оценки физиологического состояния рыб.

Под влиянием каспийской нефти происходят изменения морфоструктурных показателей сыворотки крови рыб, ГГБ и ГЭБ, уровень которых находится в прямой зависимости от длительности воздействия токсиканта.

С изменением проницаемости на фоне деструктивных процессов в сыворотке крови токсикоз, видимо, вступает в новую фазу своего развития разрушающего характера. Увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) зарегистрировано и по проницаемости ГГБ печени и мышц.

Изучение локальной структурной организации сыворотки крови является перспективным для разработки новых методов оценки состояния организма рыб в условиях прессинга техногенных факторов химической природы.

Список использованной литературы:

1. Албертс Б., Брей Д., Люис Дж. Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1986. – Т. I. – 223 с.
2. Бернал Х. Возникновение жизни. – М.: Мир, 1969. – 391с.
3. Браун Г., Уолкен Дж. Жидкие кристаллы и биологические структуры. – М.: Мир, 1982. – 198 с.
4. Де Же В. Физические свойства жидкокристаллических веществ. – М.: Мир, 1982. – 175 с.
5. Кассиль Г.Н. Гистоэнцефалический барьер. М.: Изд-во Академии наук СССР. 1963. – 407 с.
6. Кассиль Г.Н. Внутренняя среда организма. М.: Наука, 1978. С. 223.
7. Минц Р.И., Кононенко Е.В. Жидкие кристаллы (мезофазы) в организме человека // Арх. патологии. – 1981. – Т.43., №7. С. 3-11.
8. Росин Я.А. Учение Л.С. Штерн о гистогематических барьерах. Сборник «Гистогематические барьеры и нейрогуморальная регуляция». М.: «Наука», 1981.
9. Справочник «Биохимические методы исследования в клинике», 1969.
10. Чистяков И.Г., Усольцева В.А., Селезнев С.А. Жидкие кристаллы и их биологическое значение // Успехи совр. биологии. – 1976. Т. 82. С. 89-101..
11. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Клиническая кристаллография: становление, проблемы, перспективы // Кристаллографические методы исследования в медицине: Сб. науч. тр. – М., 1997. – С. 3-25.
12. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Принципы аутоволевой самоорганизации биологических жидкостей // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2000. №3. С.45-49.
13. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Фундаментальные основы биологических ритмов // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2001. №8. С. 4-7.