

УДК 591.8:591.436.2:597.551.2:597.552.1

ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПЕЧЕНИ У ПЛОТВЫ (*RUTILUS RUTILUS*) И ЩУКИ (*ESOX LUCIUS*), ОБИТАЮЩИХ В РАЗНЫХ ПО АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКЕ ОЗЕРАХ

© 2014 г. С. А. Мурзина, З. А. Нефедова, С. Н. Пеккоева, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

e-mail: murzina.svetlana@gmail.com

Поступила в редакцию 07.05.2013 г.

С использованием гистологических методов анализа обнаружены различия в гистоморфологическом состоянии печени у рыб, обитающих в озерах с различной антропогенной нагрузкой. К числу наиболее значимых морфологических изменений в печени плотвы из оз. Костомукшское (накопитель отходов ГОКа Костомукшский) относятся начальные проявления паренхиматозной белковой дистрофии и в меньшей степени — липидная дистрофия, в то время как в печени щуки установлено доминирование липидной дистрофии. В печени плотвы и щуки из оз. Койвас, расположенного на удалении 20 км от источника загрязнения, выявлены лишь начальные стадии дистрофических изменений локального характера. Щука по сравнению с плотвой наиболее чувствительна к сложившейся экологической обстановке в оз. Костомукшское, включая повышенную минерализацию. У рыб из чистого оз. “Каменное” (район заповедника) изменений в структуре печени не обнаружено.

Ключевые слова: экология, биоиндикация, гистоморфология, адаптация, рыбы, липиды.

DOI: 10.7868/S036705971402005X

Экологические факторы оказывают различно-го рода воздействия на организм. В комплексной оценке состояния рыб, обитающих в водных экосистемах с повышенной антропогенной нагрузкой, давно используется целый ряд методов эколого-физиологической и эколого-биохимической индикации (Немова, Высоцкая, 2004; Моисеенко, 2009; Биота северных озер..., 2012; Stehr et al., 1997; Handy et al., 2002; van der Oost et al., 2003; Iwaniwicz et al., 2012). Следует отметить, что любой патологический процесс начинается на уровне ультраструктур или биохимических систем клетки, и только после достижения некоторого уровня их дезорганизации в поврежденной клетке начинают проявляться морфологические изменения (Ипатова, 2005). В настоящее время экотоксикологические исследования направлены на поиск гистологических биомаркеров, наиболее чувствительных к воздействию токсических веществ. Печень рыб является наиболее подходящим органом для подобных исследований, поскольку изменения ее морфологии (внутриклеточных структур) являются предпосылкой к ряду изменений в метаболизме как отдельного органа (печени), так и других взаимосвязанных систем организма. Морфологические изменения в других органах и тканях (мышцы, гонады и т.д.)

можно рассматривать, прежде всего, как следствие снижения детоксикационной функции печени.

В настоящей работе приводятся результаты гистологического анализа морфологической структуры печени плотвы и щуки (наиболее массовых видов рыб исследуемых озер), обитающих в разных по удаленности от источника загрязнения водоемах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Сбор проб проводился в июне 2012 г. в ходе экспедиции на оз. Костомукшское и оз. Койвас (озерно-речная система р. Кенти, Республика Карелия). Озеро Костомукшское (30°50' с.ш., 64°40' в.д.) — верхний водоем системы р. Кенти и хранилище инфильтрационных вод Костомукшского горнообогатительного комбината (так называемое “хвостохранилище” отходов). Общая минерализация воды хвостохранилища достигает 645 мг/л, концентрация (в мг/л) ионов составляет: K^+ — 156, Na^+ — 18, Ca^{2+} — 38, Mg^{2+} — 18, Cl^- — 7, HCO_3^- — 122, общего азота — 15, общего фосфора — 0.007–0.012; pH 7.4–7.5. Главный загрязняющий фактор вод хвостохранилища — высокая минерализация (до 645 мг/л), щелочная среда и высокие кон-

центрации ионов K^+ и HCO_3^- . Кроме того, для его вод характерно наличие мелкодисперсной механической взвеси, которая затрудняет дыхание и пищеварение рыб.

Озеро Койвас ($31^{\circ}01'$ с.ш., $64^{\circ}48'$ в.д.) — шестое после водохранилища озеро системы р. Кенти. Озеро является глубоководным и олиготрофным, рассматривается как относительно чистое в связи с тем, что находится на значительном удалении от комбината (Состояние водных объектов..., 2007). Средний pH — 7.25, в придонном слое количество K^+ составляет 32.1 мг/л, Na^+ — 4.6, Ca^{2+} — 12.9, Mg^{2+} — 5.2, Cl^- — 2.4, Alk — 48.2 мг HCO_3^- /л (Состояние водных объектов..., 2007).

В качестве контроля были использованы рыбы, выловленные в оз. Каменное ($64^{\circ}28'$ с.ш., $30^{\circ}13'$ в.д., верхнем водоеме системы рек Каменная — Чирка-Кемь), которое расположено в границах заповедника “Костомукшский”. В целом гидрохимические и гидробиологические показатели этого водоема существенно не изменились с момента ввода и в период работы ГОКа (Морозов, 1998). Озеро характеризуется высоким качеством воды: низкой минерализацией (9.5 мг/л), низким содержанием биогенных соединений (общий азот — 0.41 мг/л, общий фосфор — 0.005 мг/л), железо общее в среднем — 0.10 мг/л; pH 5.97–6.49 (Иешко, 1998; Морозов, 1998; Ильмаст и др., 2010).

Для проведения гистологического анализа было выловлено 11 особей плотвы и 13 особей щуки из оз. Костомукшское, 12 особей плотвы и 15 особей щуки из оз. Койвас, а также 5 особей плотвы и 14 особей щуки из оз. Каменное. Возраст рыб 5+...7+.

Для гистологического анализа кусочки ткани (1×1 см) печени плотвы и щуки извлекали из свежего материала и закладывали в гистологические кассеты, которые затем помещали в контейнер с 10%-ным забуференным раствором формальдегида. Пробы хранили в холодильнике ($-8^{\circ}C$) до момента доставки в лабораторию. Анализ материала проводили с использованием оборудования ЦКП Института биологии КарНЦ РАН. Проводку и пропитку парафином осуществляли через автоматическую систему карусельного типа — модель STP-120 (MICROM). Парафиновые блоки изготавливали с использованием заливочного комплекса EC-350 (MICROM), их резку осуществляли на санном микротоме HM-440 (MICROM) с толщиной среза 6 мкм. Окраска гистологических срезов проводилась гематоксилин-эозином. Микроснимки изучали с использованием светового микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss) с окуляром $\times 10$ и объективами $\times 5$; $\times 10$; $\times 20$; $\times 40$; $\times 100$ и цифровой камеры Pixera Pro 150ES. В работе использованы методические рекомендации Е.В. Микодиной с соавт. (2009).

Достоверность различий ($p \leq 0.05$) размеров гепатоцитов исследуемых видов рыб оценивали с

помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета Statgraphics for Windows 2.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Паренхиматозное строение печени плотвы и щуки, обитающих в чистом оз. Каменное (бассейн р. Кемь), оказалось без видимых повреждений с нормально окрашенными гепатоцитами (рис. 1, 2), что позволяет оценить состояние печени рыб из этого озера как “норму”. Результаты гистологических исследований морфологической структуры печени плотвы и щуки, обитающих в водах техногенного оз. Костомукшское, позволили выявить ряд патологических изменений. Популяция плотвы из оз. Костомукшское на 82% состоит из особей, в печени которых выявлены начальные патологические изменения (рис. 3), а у рыб из оз. Койвас — на 50% (рис. 4). Начальная стадия паренхиматозной белковой дистрофии (нарушение метаболизма белков) была установлена в печени плотвы из оз. Костомукшское (см. рис. 3) и в меньшей степени у рыб из озера Койвас. У большей части гепатоцитов наблюдались мелкие зерна белка округлой формы. Известно, что при таких изменениях гепатоциты начинают объединяться в отдельные группы, что указывает на некоторое атипичное строение паренхимы (<http://my-coralclub.net/anatom/710-anatom.html>). Кроме того, у одной особи плотвы из оз. Костомукшское была установлена “пенистая” структура печени, что характерно для липидной дистрофии — липидная капля занимает весь объем гепатоцита, в некоторых случаях может происходить разрыв мембран и излияние содержимого, в результате чего образуются жировые кисты, разные по размеру и форме (Яковенко и др., 2003).

В 50% исследованной печени плотвы из оз. Койвас обнаруживалась начальная стадия дистрофических изменений (см. рис. 4). Обращает на себя внимание, что по интенсивности развития дистрофии печень плотвы неоднородна — у визуально нормальной печени встречаются участки с начальными признаками морфологических изменений. Более того, у плотвы из оз. Койвас (3 особи) установлено наличие небольших узлов в печени. Как правило, узлы формируются в местах повреждения, что указывает на способность печени к регенерации (Жункейра, Карнейро, 2009). Известно, что при сочетании абиотических и биотических факторов в сторону более благоприятных (в частности, при изменении качественного и количественного состава пищи, ее доступности), а также снижении прессинга антропогенного воздействия на водные экосистемы могут иметь место обратимые процессы, направленные на восстановление структуры печени у рыб. В определенных физиологических пределах

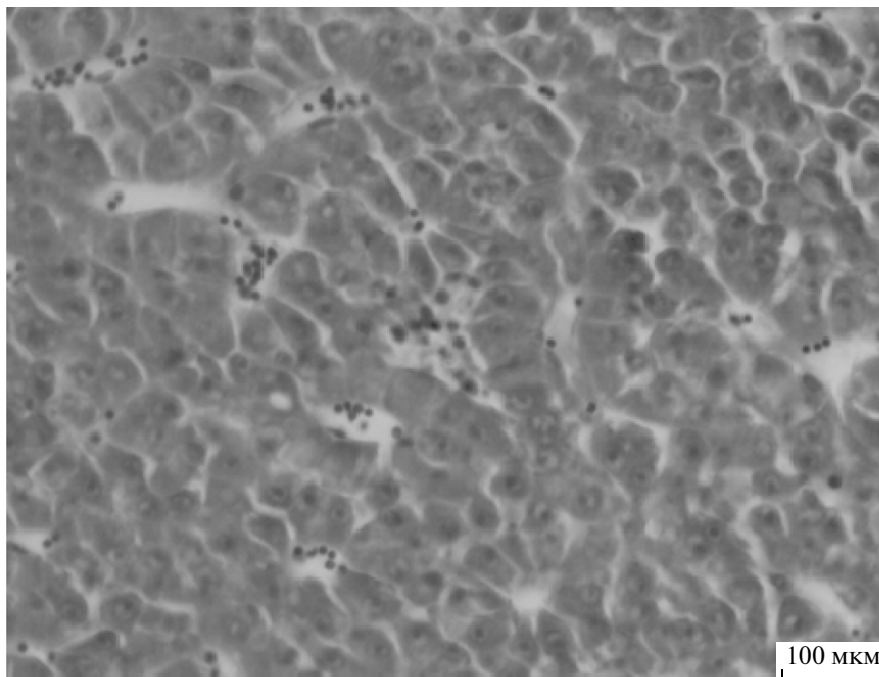


Рис. 1. Структура печени плотвы из оз. Каменное. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 400$.

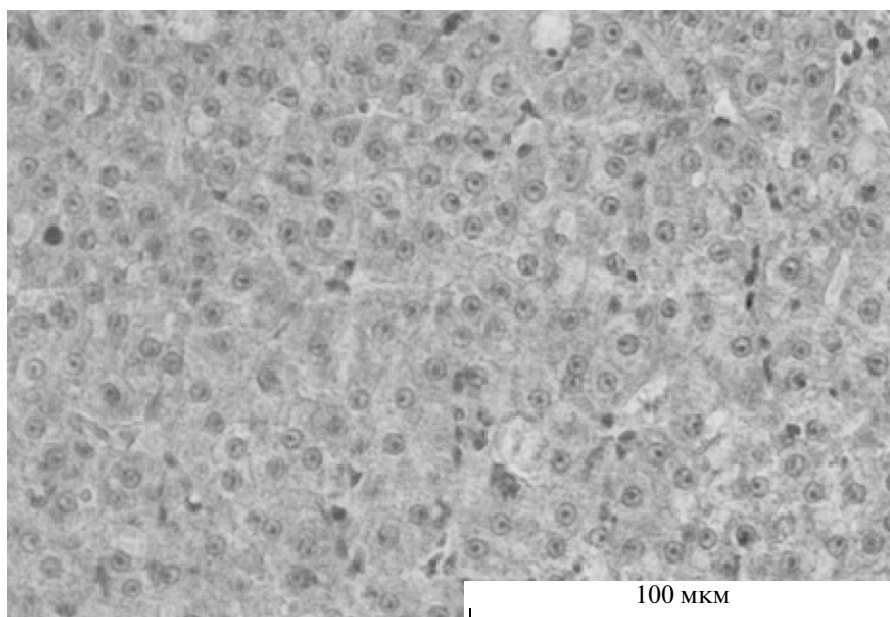


Рис. 2. Структура печени щуки из оз. Каменное. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 400$.

и при непродолжительном воздействии неблагоприятных факторов печень может проявлять высокую степень резистентности (Крючков, 2010).

По сравнению с плотвой щука в большей степени реагирует на изменение среды обитания. Популяция щуки из оз. Костомукшское на 67% представлена особями с сильно дистрофичной печенью (рис. 5), из оз. Койвас – на 57% (рис. 6).

Показана сильная вакуолизация печени, как следствие липидной инфильтрации гепатоцитов. Визуально печень щуки из “хвостохранилища” отходов ГОКа отличалась от таковой у щуки из оз. Койвас по цвету. Она имела ярко-желтую или мутно-желтую окраску и была увеличена в размерах. Степень развития липидной дистрофии у щуки из оз. Костомукшское различалась от мелкока-

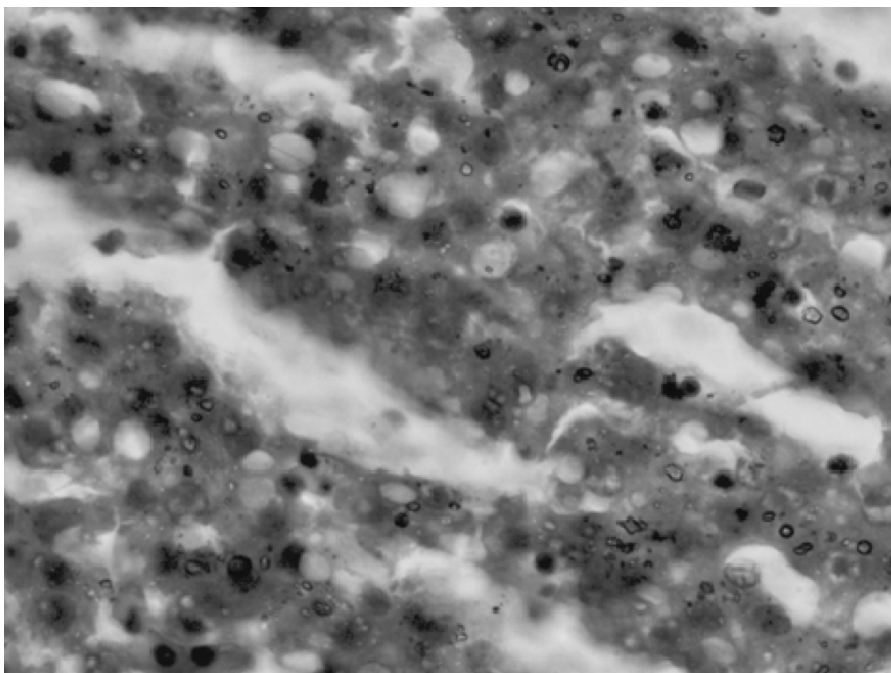


Рис. 3. “Пенистая” структура печени плотвы из оз. Костомукшское. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 1000$.

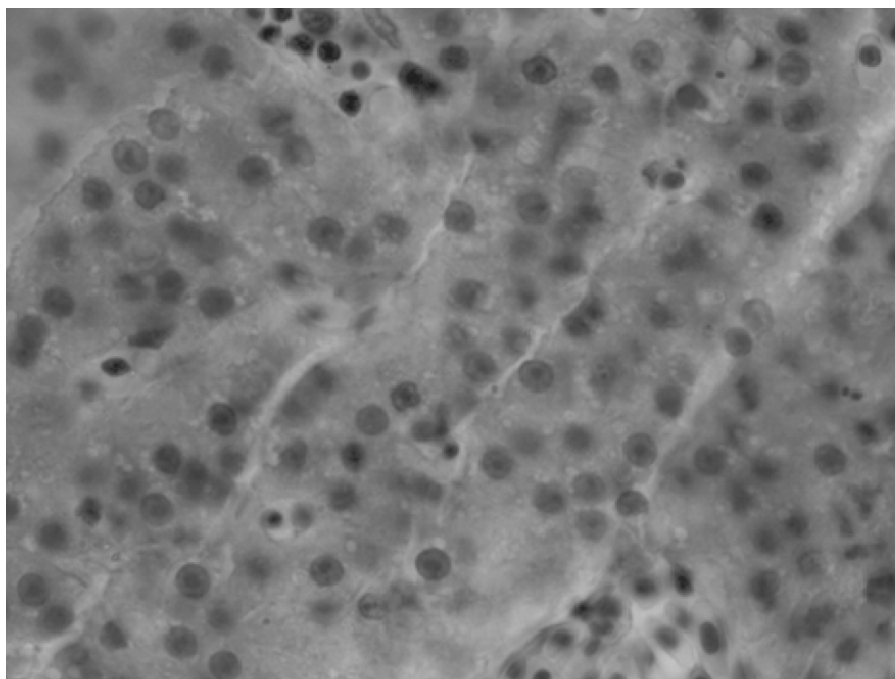


Рис. 4. Структура печени плотвы из оз. Койвас, начальная стадия липидной инфильтрации. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 1000$.

пельной до крупнокапельной. Возможный механизм токсического воздействия на липидный обмен заключается в повреждении мембранных структур, ответственных за перекисное окисление липидов. Повышенный уровень липидов

(триацилглицеринов) и нарушение окисления жирных кислот вызывают выраженную аккумуляцию липидов (Gautam, Parihar, 1996). При таком виде патологии происходит смещение равновесия между уровнем свободнорадикального

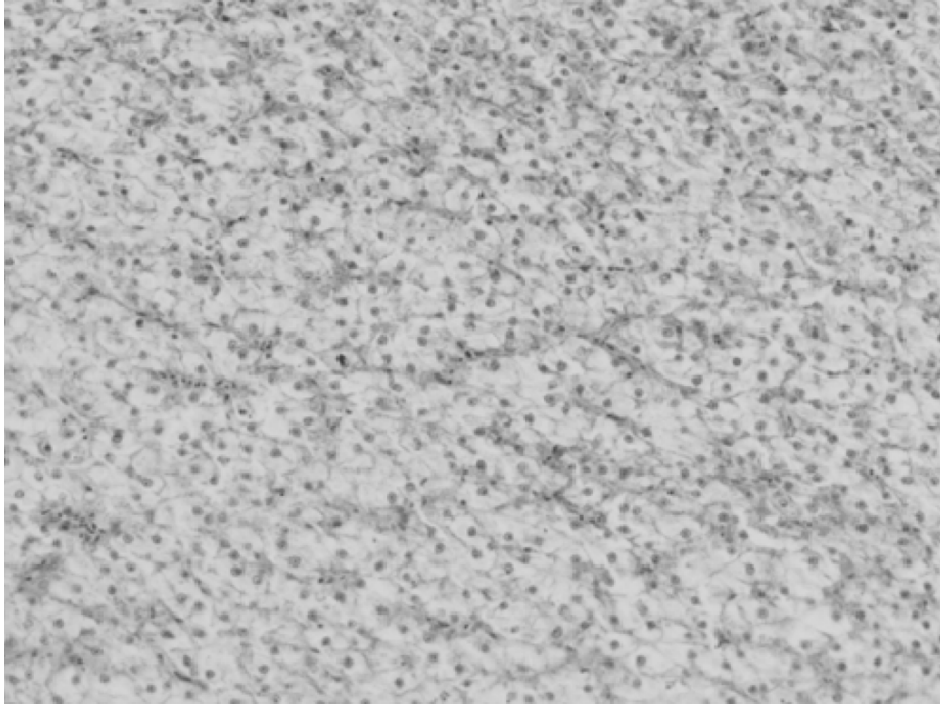


Рис. 5. Крупнокапельная липидная дистрофия печени щуки из оз. Костомукшское. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$.

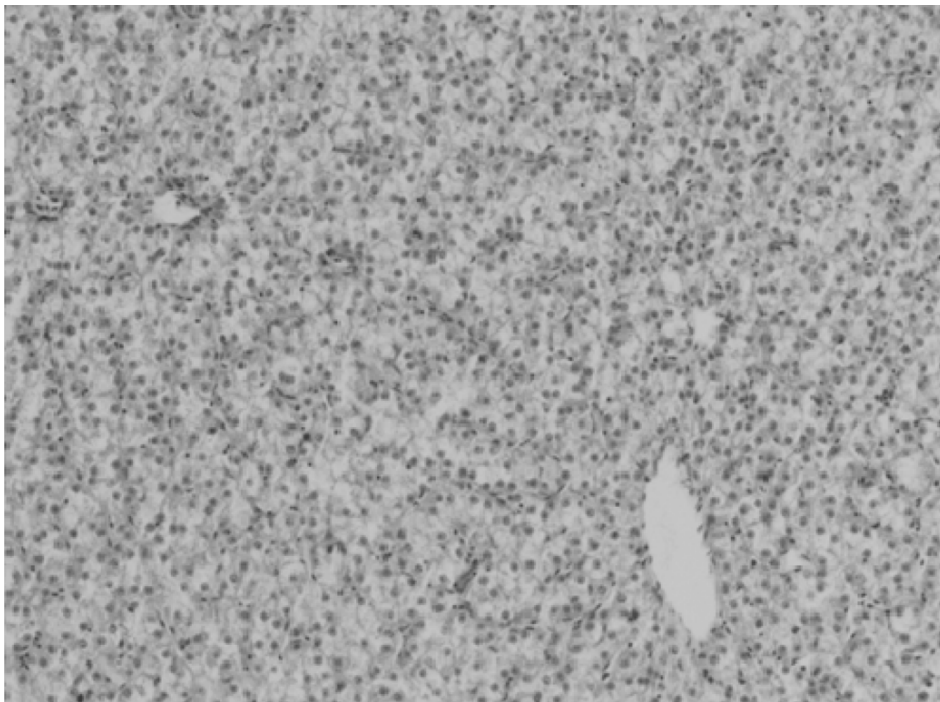


Рис. 6. Липидная дистрофия печени щуки из оз. Койвас. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$.

окисления и активностью антиоксидантных систем в сторону первого (Niemela et al., 1995; Burt et al., 1998; Moseley, 2003). В результате избыточного накопления продуктов перекисного окисле-

ния липидов (ПОЛ) нарушается обмен липидов в организме (увеличение количества свободных жирных кислот, триацилглицеринов, холестерина, снижение количества структурных липидов —

Размеры гепатоцитов в печени у плотвы и щуки из озер Костомукшское и Койвас, мкм

Вид рыбы	Место сбора	
	озеро Койвас	озеро Костомукшское
Плотва	7.65 ± 0.10	8.91 ± 0.16*
Щука	8.75 ± 0.15	10.29 ± 0.18*

* Достоверное отличие $p \leq 0.01$.

фосфолипидов) (Яковенко и др., 2003; Богушевич и др., 2010; Поляков и др., 2011; Niemela et al., 1995). Ранее (Биота северных озер..., 2012) с помощью биохимических методов было показано, что в печени щуки из оз. Костомукшское происходит накопление триацилглицеринов, холестерина и продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида).

Установленные патологические изменения в гепатоцитах печени плотвы и щуки отражаются и на их размерных характеристиках. Размеры клеток печени у плотвы и щуки (8.91 и 10.29 мкм соответственно) из оз. Костомукшское были достоверно ($p \leq 0.01$) большими по сравнению с таковыми у рыб из оз. Койвас (7.65 и 8.75 мкм соответственно) (см. таблицу).

Таким образом, несмотря на то, что архитектура печени плотвы и щуки из всех исследованных озер сохранена, в печени рыб из оз. Костомукшское (“хвостохранилища” отходов ГОКа) обнаруживаются заметные патологические изменения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что щука по сравнению с плотвой наиболее уязвима к изменению качества воды. Степень воздействия антропогенной нагрузки на гистоморфологическое состояние печени исследуемых видов рыб уменьшается по мере удаления от источника загрязнения. Можно полагать, что в условиях изменения состояния водоема (повышенная минерализация, мелкодисперсная механическая взвесь, изменение качественного и количественного состава пищи) происходит перестройка метаболизма рыб, связанная с жиронакоплением в печени, которая выражается в увеличении размеров гепатоцитов, замещении форменных элементов клетки на жировые капли. Формирование липидных капель в гепатоцитах (или между ними) является следствием нарушения липидного обмена.

В большинстве случаев патологические изменения носили характер дистрофий по типу инфильтрации и декомпозиции (накоплении веществ разной природы в клетке и распаде белково-липидных комплексов). Возможно, у исследуемых рыб одним из механизмов эколого-биохимической адаптации к антропогенному воздействию и изменению вследствие этого отдельных компонентов озерной экосистемы является повышение

образования резервных липидов, что позволяет им приспособиться к изменяющейся экологической ситуации. Вместе с тем выявленные деструктивные процессы в печени могут отрицательно сказаться на репродуктивной системе рыб (количестве и качестве отложенной икры, проценте вылупления личинок) и в итоге на формировании промысловой численности рыб. Изменения гистоморфологии печени у исследованных видов рыб (у щуки в большей степени) могут быть использованы в качестве дополнительных биоиндикаторов при оценке экологической ситуации в водоеме.

Авторы выражают благодарность Е.П. Иешко, Е.В. Борвинской и И.В. Суховской за сбор материала в полевых условиях. Работа выполнена при поддержке грантов Программы Президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-1642.2012.4) и молодых российских ученых (МК-666.2011.4), РФФИ (11-04-00167-а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” ГК № 02.740.11.0700 и Соглашение № 8050, Программы фундаментальных исследований ОБН РАН “Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий” (№ 01201262104).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия. Ред. Немова Н.Н. и др. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012. 230 с.
- Богушевич О.С., Завада Н.В., Пикиреня И.И. и др. Особенности обмена липидов в послеоперационном периоде у экспериментальных животных, перенесших гастроэктомию // Новости хирургии. 2010. Т. 18. № 4. С. 23–30.
- Жункейра Л.К., Карнейро Ж. Гистология: Учеб. пос. Атлас. М.: Издательская группа ГЭОТАР–Медиа, 2009. 576 с.
- Иешко Е.П. Оценка влияния сбрасываемых вод хвостохранилища Костомукшского ГОКа на озерно-речную систему // Горный журнал. 1998. № 4. С. 89–91.
- Ильмаст Н.В., Стерлигова О.П., Кучко А.Я. Биология сига Костомукшского хвостохранилища (Республика Карелия) // Экологические проблемы Северных регионов и пути их решения: Тез. докл. III Всерос. научн. конф. с международным участием. Апатиты, 2010. С. 187–189.
- Крючков В.Н. Морфофизиологические механизмы регенерации печени рыб после токсического повреждения // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Мат-лы III междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. С. 89–91.

- Микодина Е.В., Седова М.А., Чмилевский Д.А. и др. Гистология для ихтиологов: опыт и советы. М.: Издательство ВНИРО, 2009. 111 с.
- Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. 400 с.
- Морозов А.К. Водоемы района Костомукши. Бассейн реки Каменной. Общая характеристика. Химический состав воды // Современное состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1992–1997 гг. Петрозаводск, 1998. С. 122–125.
- Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.
- Немова Н.Н., Иешко Е.П., Мещерякова О.В. и др. Сиг *Coregonus lavaretus* (L.) Костомукшского хвостохранилища в условиях техногенного загрязнения // Экология. 2012. № 4. С. 298. [Nemova N.N., Ieshko E.P., Meshcheryakova O.V. et al. The European Whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.), under conditions of technogenic pollution in the Kostomuksha tailing pond // Russian Journal of Ecology. 2012. V. 43. № 4. P. 323–327].
- Поляков В.Ю., Гольшев С.А., Кирьянов Г.И. и др. Гепатопротекторное действие препарата на основе экстракта мицелия вешенки при развитии экспериментального стеатоза печени // Биологические мембраны. 2011. Т. 28. № 4. С. 267–273.
- Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 210 с.
- Яковенко Э.П., Григорьев П.Я., Агафонова Н.А. и др. Метаболические заболевания печени: проблемы терапии // Фарматека. 2003. № 10(73). С. 47–52.
- Burt A.D., Mutton A., Day C.P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis // Seminars in diagnostic pathology. 1998. V. 15. № 4. P. 246–258.
- Gautam R.C., Parihar R. Lead and mercury alters lipid contents in liver and kidney of *Heteropneustes fossilis* // Journal of Zoology. 1996. V. 16. № 1. P. 28–30.
- Handy R.D., Runnalls T., Russell P.M. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive // Ecotoxicology. 2002. № 11. P. 467–479.
- Iwaniwicz L.R., Blazer V.S., Hitt N.P. et al. Histologic, immunologic and endocrine biomarkers indicate contaminant effects in fishes of the Ashtabula River // Ecotoxicology. 2012. V. 21. Issue 1. P. 165–182. DOI: 10.1007/s10646-011-0776-0.
- Moseley R.H. Liver and biliary tract // Current opinion in gastroenterology. 2003. V. 19. № 3. P. 181–184.
- Niemela O., Parkkila S., Yla-Herttuala S. et al. Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation and fibrogenesis in a micropig model of alcohol induced liver disease // Hepatology. 1995. V. 22. Issue 4. P. 1208–1214. DOI: 10.1002/hep.1840220428.
- Stehr C.M., Myers M.S., Burrows D.G. et al. Chemical contamination and associated liver diseases in two species of fish from San Francisco Bay and Bodega Bay // Ecotoxicology. 1997. V. 6. № 1. P. 35–65.
- Van der Oost R., Beyer J., Vemeulen N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2003. V. 13. P. 57–149.
- <http://my-coralclub.net/anatom/710-anatom.html> – Паренхиматозные и белковые дистрофии.