

8. Durkina V.B., Evtushenko Z.S. Changes in activity of certain enzymes in sea urchin embryos and larvae after exposure of adult organisms to heavy metals // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1991. V. 72. P. 111-115.
9. Сясина И.Г., Вещенко М.А., Дуркина В.Б. Гистопатологические изменения гонад морских ежей при действии тяжелых металлов // Биология моря. 1991. № 4.

Дуркина Валентина Борисовна

Автореферат

ВЛИЯНИЕ МЕДИ И ЦИНКА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ
И РАННИЙ ОНТОГЕНЕЗ МОРСКИХ ЕЖЕЙ.

Подписано к печати 19.05.92г. Формат 60/84/16.

Печать офсетная. Усл.п.л.1,16. Уч.-изд.л.0,8.

Тираж 100 экз. Заказ 51. Бесплатно.

Отпечатано в офсетно-ротапринтном цехе издательства
"Дальнаука", 690600 Владивосток, Ленинская, 50.

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ МОРЯ
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН

На правах рукописи

ДУРКИНА

Валентина Борисовна

УДК: 593.1 + 591.46 +

593.95 + 574.64

ВЛИЯНИЕ МЕДИ И ЦИНКА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ
И РАННИЙ ОНТОГЕНЕЗ МОРСКИХ ЕЖЕЙ

03.00.11 - эмбриология, гистология
и цитология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток

1992

Работа выполнена в Институте биологии моря
Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Ю.С.Хотимченко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
А.А.Максимович
кандидат биологических наук
С.М.Дзюба

Ведущая организация: Институт биологии развития РАН

Защита состоится "30" июня 1992 года на заседа-
нии Специализированного совета К 033.66.02 при Президиуме
Дальневосточного отделения РАН (690032 Владивосток, ул. Паль-
чевского, 17, ИБМ)

С диссертации

Авторофер:

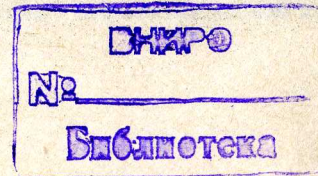
Ученый
Специе
кандид

ова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Хозяйственная деятельность челове-
ка в современных условиях приводит к тому, что ежегодно в био-
сфере рассеивается миллионы тонн микроэлементов, которые завер-
шают свой геохимический цикл в океане. Создавая ситуации лока-
льного или глобального загрязнения и накапливаясь в морской био-
те, металлы могут существенно изменять характер и интенсивность
биологических процессов. Для установления биологических послед-
ствий антропогенного изменения морской среды рекомендуется изуче-
ние длительного воздействия низких концентраций токсикантов на
массовые виды гидробионтов и их репродуктивные функции (Патин,
1972). Загрязнение окружающей среды вызывает гормональные сдвиги
в организме животных, изменяет их пищевое и репродуктивное поведе-
ние, влияет на развитие гамет и накопление питательных веществ в
овоцитах, нарушает созревание половых клеток и их способность к
оплодотворению, приводит к аномальному развитию эмбрионов и сни-
жению выживаемости молоди (Davis, 1972; Mitrovic, 1972; Ireland,
1974; Dixon, 1983; Sunila, 1986; Doug, Derek, 1989).

Несмотря на важность изучения действия низких доз тяжелых
металлов на репродуктивную систему водных животных, к настоящему
времени исследования по этой проблеме представлены немногочислен-
ными работами (Reish, Carr, 1978; Verriopulos, Nardovelis,
1988), выполненными на экспериментальных животных с коротким жиз-
ненным циклом, позволяющими за относительно короткий период про-
следить за развитием нескольких поколений. Использование моллюс-
ков, иглокожих и ракообразных связано с необходимостью постанов-
ки длительных, в течение нескольких месяцев экспериментов, что
не всегда может быть осуществлено практически. В большинстве вы-



полненных исследований изучено влияние тяжелых металлов в концентрациях, в десятки и сотни раз превышающих уровни микроэлементов, зарегистрированные в прибрежных акваториях (Lewis, Cave, 1982; Мур, Рамамурти, 1987; Anil, Wagh, 1988; Христофорова, 1989; Bor-Cheng, Tsu-Cang, 1990; Шулькин, 1990), при этом у животных наблюдали деструктивные изменения в гонадах, замедление или полное подавление созревания половых клеток, снижение плодовитости и появление аномального потомства (Saliba, Ahsanullah, 1973; Reish, Carr, 1978; Muir, Tyler, 1982; Sunila, 1984; Карасева, 1988; Сякина, 1988). Вместе с тем, у животных, обитающих в загрязненных акваториях, где уровни тяжелых металлов значительно ниже экспериментальных, кроме перечисленных реакций, были отмечены явления преждевременного формирования зрелых гамет, череста вне сезона размножения, увеличения плодовитости, уменьшения размеров яиц, снижения жизнеспособности потомства и увеличение частоты анеуплоидии у эмбрионов (Ireland, 1974; McFarlane, Franzin, 1978; Dixon, 1982; Dixon, Pollard, 1985; Sunila, 1986).

Известно, что ранние стадии развития гидробионтов более чувствительны к воздействию повреждающих факторов, чем взрослые особи, и эти факторы инициируют появление многочисленных аномалий в течение эмбриогенеза и личиночного развития (Elderfield, 1971; Kobayashi, 1972; Watling, 1982; Дуркина, Гнездилова, 1985; Ajmal-khan et al., 1986; Щеглов, Григорай, 1987). В то же время в загрязненных прибрежных водах, где происходят нерест и развитие водных животных, у эмбрионов и личинок, кроме повреждений, вызванных прямым действием токсикантов, несомненно, реализуются повреждения, нанесенные гаметам во время ово- и сперматогенеза. Механизмы опосредованного действия тяжелых металлов на потомство, через половые клетки родительских особей, остаются практически неисследо-

ванными. Раскрытие этих механизмов позволит оценить развитие и жизнеспособность потомства, качество и степень повреждения гамет родительских особей, подвергавшихся воздействию токсикантов. Это особенно важно для прогнозирования отдаленных последствий загрязнения водной среды тяжелыми металлами в отношении морских беспозвоночных, имеющих ценное промысловое значение.

Цель и задачи работы. Интерес к меди и цинку, как загрязнителям водной среды, объясним тем, что в отличие от ряда тяжелых металлов, таких как ртуть, свинец и кадмий, эти металлы относятся к жизненнонеобходимым. В строго определенных количествах они выполняют специфические биологические функции и не вызывают токсического действия, так как в организме существуют гомеостатические механизмы, контролирующие их содержание в тканях и органах. В то же время, увеличение содержания меди и цинка в водной среде приводит к неблагоприятным последствиям для биоты (Lewis, Cave, 1982). Цель настоящей работы состояла в экспериментальном исследовании опосредованного влияния меди и цинка на эмбриональное развитие потомства морских ежей, подвергнутых воздействию этими металлами.

Для достижения цели работы предполагалось решить следующие задачи:

1. Исследовать рост и динамику состава гамет в яичниках и семенниках морских ежей, содержащихся с медью и цинком.
2. Дать морфологическое описание гонад и половых клеток морских ежей, содержащихся с медью и цинком.
3. Оценить качество гамет морских ежей, содержащихся с медью и цинком, на основании эмбрионального и личиночного развития потомства и его жизнеспособности.
4. Определить активность кислой и щелочной фосфатаз, глюко-

зо-6-фосфатазы, Mg^{2+} -АТФазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, содержание нуклеиновых кислот, общего белка и нейтральных полисахаридов в эмбрионах, полученных из гамет морских ежей, содержащихся с медью и цинком.

Научная новизна и практическое значение работы. Впервые показано, что выдерживание морских ежей с повышенными концентрациями таких жизненно необходимых микроэлементов, как медь и цинк, оказывает влияние на эмбриональное и личиночное развитие потомства подопытных животных. В гонадах морских ежей, содержащихся с тяжелыми металлами, обнаружены морфологические изменения в половых и соматических клетках. Выявлены не отмечавшиеся ранее стимуляция роста овоцитов при действии низкой концентрации меди, возрастание численности овоцитов в гонадах при действии цинка, а также замедление дифференцировки мужских половых клеток у животных, содержащихся с медью и цинком. Установлено, что воздействие тяжелых металлов на половую железу морских ежей носит дозозависимый неспецифический характер. Впервые выявлен переходящий стимулирующий эффект меди и летальное действие цинка на потомство подопытных животных, наблюдающиеся на стадии планулы I. Установлено изменение активности ряда ферментов на эмбриональных и личиночных стадиях, а также изменение содержания нуклеиновых кислот и общего белка в первичных мезенхимных клетках гастролы, полученных из гамет морских ежей, содержащихся с медью и цинком.

Полученные данные могут быть использованы для прогнозирования отдаленных биологических последствий загрязнения водной среды тяжелыми металлами для воспроизводства морских ежей, которые являются ценными промысловыми объектами. Результаты исследования могут быть учтены при разработке чувствительных тестов для целей

биомониторинга.

Апробация работ. Основные результаты работы были представлены на X Всесоюзной научной конференции "Микроэлементы в биологии и их применение в медицине и сельском хозяйстве" (Чебоксары, 1986), IV Всесоюзной конференции по промышленным беспозвоночным (Севастополь, 1986), III Всесоюзной конференции по морской биологии (Севастополь, 1988), V Всесоюзной конференции по водной токсикологии (Одесса, 1988), на Цитологических семинарах Института биологии моря ДВО АН СССР.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, пяти глав и выводов; список литературы включает 202 работы отечественных и зарубежных авторов. Диссертация включает 148 стр., из них 18 таблиц, 21 рисунок (светооптические и электронные микрофотографии, диаграммы).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на половозрелых морских ежах *Strongylocentrotus intermedius* и *Strongylocentrotus nudus* с диаметром панциря 4 - 10 см, обитающих в заливах Посыет и Петра Великого Японского моря (бухта Витязь, пролив Старка). Животных собирали с помощью легководолазной техники и помещали в аквариумы с аэрируемой проточной морской водой.

Морфологические методы. Для гистологического изучения органов и тканей материал фиксировали в жидкости Буэна и спирт-уксусной кислоте (3:1) и заключали в парафин по общепринятым методикам. Срезы толщиной 4-5 мкм, приготовленные на замком микротоме, окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозинем. Размеры адипосов, овоцитов и зон семенников определяли при помощи рисовального ап-

парата РА-5 и планиметра ШПМ. Объемы клеток определяли по формуле объема эллипсоида вращения. В каждом препарате измеряли по 20-100 внутриорганных структур. Число мужских и женских половых клеток в ацинусах на разных стадиях гаметогенеза подсчитывали под микроскопом при малом и большом увеличении.

Гистохимическими методами исследовали белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты. Суммарные белки на парафиновых срезах окрашивали прочным зеленым, рН 2,2 (Дуппа, 1980). Контрольные препараты обрабатывали пептидазой. Перед окраской нуклеиновые кислоты экстрагировали I и HCl при 37°C в течение 2 ч. Для выявления полисахаридов применяли реакцию ШИК по Мак-Манусу (Пирс, 1962). Контрольные срезы обрабатывали L-амилазой; гликоливые группы блокировали апитилированием. Окраску нуклеиновых кислот проводили галлоцианинхромовыми квасцами (Дуппа, 1980). Для выявления ДНК препараты предварительно обрабатывали РНК-азой из поджелудочной железы свиньи (1 мг/мл) в течение 2 ч при 37°C. Количественные данные об относительном содержании белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот были получены при помощи цитофотометра "Vickers M-85" методом сканирующей денситометрии. Фотометрирование белков проводили при длине волны 650 нм, полисахаридов - 550 нм, нуклеиновых кислот - 650 нм.

Для электронномикроскопического исследования кусочки гонад фиксировали в 2,5% растворе глutarальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,8), содержащем 0,5% нейтрального формалина и 1% сахарозы, при 4°C. Постфиксацию проводили в 1% растворе четырехоксида осмия на фосфатном буфере, содержащем 27% сахарозу, в течение часа. После обезвоживания, кусочки гонад заключали в эпон 812. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электрон-

ном микроскопе ЛЕМ - 100 В.

Биохимические методы. Количественное определение белков проводили модифицированным методом Лоури (Markwell et al., 1978) с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. По количеству высвобождаемого неорганического фосфата определяли активность кислой и щелочной фосфатаз (Sullivan, Volcani, 1974), Mg^{2+} -АТФазы (Stewart, 1974), глюкозо-6-фосфатазы (Barber, Foy, 1973). Фосфор определяли по методу Сехеки (Seheki et al., 1985), используя 1 мМ KH_2PO_4 в качестве стандарта. Об активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы судили по образованию восстановленного НАДФ (Кочетов, 1980).

Экспериментальные методы. Животных, собранных в море, помещали в 50 и 100 л аквариумы и 190 л ванны с аэрируемой морской водой и выдерживали в течение 4-8 дней для адаптации. После этого в аквариумы с подопытными животными вносили маточный раствор хлорида или сульфата меди или цинка для получения необходимой концентрации (табл. I). Морскую воду полностью меняли раз в два или три дня. Животных кормили ульвой и ламинарией. В контрольных и подопытных группах одного эксперимента находилось от 20 до 80 животных.

Опосредуемое влияние тяжелых металлов на эмбрионы и личинки морских ежей исследовали по модели раннего развития. Для этого у животных, достигших в эксперименте нерестовой стадии, вызывали вымет гамет при помощи инъекции в целомическую полость 1 мл 0,5М раствора KCl или электрической стимуляцией. Для культивирования эмбрионов и личинок использовали 200 мл стеклянные стаканы. После искусственного осеменения на стадиях зиготы, двух бластомеров, средней бластулы и гастролы пробы отбирали и фиксировали 0,2% формалином; на каждые 100 зародышей подсчитывали количество нор-

Таблица I

Основные эксперименты, приведенные в работе

Номер эксперимента	Вид	Дата проведения эксперимента	Продолжительность эксперимента (сут)	Температура воды, °C	Исследованный токсикант	Концентрация металла, мкг/л
1. S. mucus		10.6-15.7.1984 г.	30	16-22	Cu Cl ₂	25
2. S. mucus		10.6-27.7.1984 г.	30	16-22	Zn Cl ₂	100
3. S. intermedium		25.7-10.9.1985 г.	40	17-19	Cu Cl ₂	5
4. S. intermedium		25.7-10.9.1985 г.	40	17-19	Zn Cl ₂	50
5. S. intermedium		28.5-28.8.1986 г.	84	12-18	Cu Cl ₂	5
6. S. intermedium		25.5-28.8.1986 г.	84	12-18	Zn Cl ₂	50
7. S. intermedium		25.8-19.9.1988 г.	19	17-19	CuSO ₄ ·5H ₂ O	25
8. S. intermedium		25.8-19.9.1988 г.	19	17-19	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	250

- 8 -

- 9 -

малых особей.

Полученные количественные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Различия между средними значениями исследуемых параметров считали достоверными при $P < 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Развитие яичников и семенников морских ежей при действии меди и цинка

Предварительное изучение действия меди в концентрациях от 1 до 25 мкг/л и цинка в концентрациях от 50 до 250 мкг/л на общее состояние и репродуктивное поведение морских ежей позволило установить дозы этих металлов, оказывающих токсические и субтоксические эффекты и практически не оказывающих повреждающего действия. Для проведения основных экспериментов выбор концентраций осуществлялся на основе этих данных, а также исходя из уровней металлов, встречающихся в отдельных наиболее загрязненных акваториях. О состоянии половой системы у интактных и подопытных животных судили по соотношению стадий гонадного цикла, динамике количественного состава гамет разных фаз развития и морфометрическим показателям гонады и ее клеток.

Медь в концентрации 5 мкг/л вызывала ускоренное развитие яичников морских ежей; за время эксперимента (57 и 84 сут) они достигали более зрелых стадий полового цикла по сравнению с животными из контрольной группы (рис. 1). Одновременно увеличивались объемы овоцитов; через 57 сут после начала эксперимента у подопытных самок они достигали в среднем 19547 ± 2066 мкм³, а у интактных особей - 6291 ± 1308 мкм³ ($P < 0,05$). В яичниках морских ежей, содержащихся с медью, кроме ускоренного роста гамет было заре-

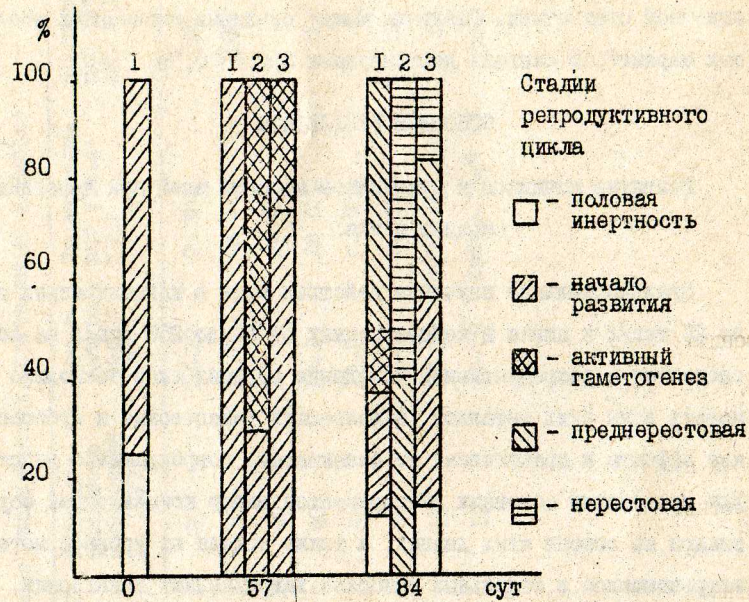


Рис. 1. Стадии репродуктивного цикла у контрольных и подопытных самок морских ежей в экспериментах с медью (5 мкг/л) и цинком (50 мкг/л). По вертикали - количество особей на данной стадии репродуктивного цикла. По горизонтали - длительность содержания животных с токсикантами. 1 - контроль, 2 - медь, 3 - цинк.

гистрировано кратковременное снижение численности овоцитов малого роста, которое восстанавливалось к концу эксперимента; а количество зрелых яиц на единицу площади ацинуса в подопытной группе существенно превысило контрольные значения и составляло в среднем, соответственно, 19 ± 8 и 1 ± 1 ($P < 0,05$).

Выдерживание морских ежей с цинком в концентрации 50 мкг/л в течение 84 сут приводило к угнетению развития яичников у большей части особей (рис. 1) и полному ингибированию роста гамет. В ходе эксперимента изменялось количество овоцитов разных стадий развития. Так, через 57 сут в результате гибели части генерации овоцитов большого роста, их количество на единицу площади ацинуса составило 56 ± 5 , по сравнению с 74 ± 6 в контрольной группе ($P < 0,05$), а через 84 сут численность овоцитов малого и большого роста превышала в 1,5-2 раза аналогичные показатели у интактных животных.

Анализ стадий гонадного цикла семенников контрольных и подопытных животных не выявил между ними статистически значимых различий. Также не были обнаружены различия между экспериментальными группами морских ежей, находящихся на нерестовой стадии гонадного цикла, при сопоставлении относительных площадей зоны размножения и роста и зоны формирования. Однако, металлы вызвали увеличение количества гамет в зоне размножения и роста (табл.2), которое было обусловлено замедлением дифференцировки гамет; так, если в контроле у животных в семенниках преобладали сперматозоиды, то у особей из эксперимента с медью (5 мкг/л) соотношение сперматогоний и сперматозоидов было примерно одинаковым, а у животных из эксперимента с цинком (50 мкг/л) количественные значения сперматозоидов достоверно превышали тестовые сперматогоний.

Таблица 2

Количество гамет^I в зоне размножения и роста ацинусов у самцов морских ежей, содержащихся с медью и цинком.

Условия содержания взрослых особей	n	Общее количество	Спермато-гонии	Спермато-циты
Контроль	4	14 ± 6	10 ± 4	4 ± 1
Медь (5 мкг/л)	2	49 ± 7	26 ± 4	23 ± 3
Цинк (50 мкг/л)	5	36 ± 5 ^x	14 ± 2	22 ± 3 ^x

Примечание: I - количество гамет на единицу площади препарата; n - количество исследованных животных; x - P < 0,05.

Таким образом, тяжелые металлы способны как стимулировать, так и подавлять развитие половой железы и рост овоцитов. Очевидно, та или другая реакция гонады отражает разные фазы ее повреждения и зависит от концентрации используемого токсиканта. Увеличение численности овоцитов в яичниках подопытных животных может быть связано со всплеском пролиферативной активности овогоний в результате разрушения и гибели половых клеток предыдущей генерации и является компенсаторной реакцией гонады, направленной на восстановление ее структуры и функции.

Гистопатология гонад морских ежей при действии меди и цинка

Морфологические изменения, наблюдаемые в половых и соматических клетках гонады исследованных морских ежей были одинаковы при действии повреждающих концентраций как меди, так и цинка. Если доза металла была небольшой, то формировались зрелые гаметы без каких-либо признаков повреждения, как это наблюдали после

выдерживания животных с медью в концентрации 5 мкг/л. Повышение концентрации меди до 25 мкг/л вызывало вначале вакуолизацию цитоплазмы, а затем массовую деструкцию половых клеток в яичниках. Выдерживание животных с цинком в концентрации 50 мкг/л и выше, также приводило к разрушению гамет, которые характеризовались признаками зернистой и гидropической дистрофии, пикнозом ядер, их лизисом и вакуолизацией ядрышек. Погибающие зрелые и незрелые яйца в дальнейшем подвергались резорбции вспомогательными клетками гонады.

Электронномикроскопические исследования выявили фрагментацию канальцев эндоплазматической сети в овоцитах животных, содержащихся с токсикантами. В эпителиальных клетках гонады наблюдали уплотнения цитоплазмы, пикноз ядер, исчезновение плотных контактов между клетками. Во вспомогательных клетках обнаруживали расширение цистерн эндоплазматического ретикулума.

Гистопатологические изменения в семенниках морских ежей были наиболее выражены при действии высоких концентраций меди и цинка. Во вспомогательных клетках гонады встречались в большом количестве глобулы, заполненные разрушающимися половыми клетками, что свидетельствует об усилении их фагоцитарной активности. В сперматоцитах обнаруживали конденсацию и смещение хроматина, пикноз ядер и разрушение мембраны ядер и цитоплазматических оргanelл.

Таким образом, сходство изменений, возникающих в гаметах и соматических клетках гонады при действии меди и цинка, свидетельствует о неспецифическом характере повреждений. Степень выраженности гистопатологических картин, как правило, зависела от концентрации токсикантов и длительности их воздействия.

Эмбриональное и личиночное развитие потомства морских ежей, содержащихся с медью и цинком

У потомства животных, подвергнутых действию меди и цинка в разных концентрациях, наблюдали замедление дробления, которое проявлялось в уменьшении количества зародышей на стадии 2-х бластомеров и снижении процента нормальных бластул, а также торможение процесса гаструляции (табл. 3). Кроме этого, изменялись размеры личинок и отмечалось снижение их жизнеспособности. Отклонения, которые выявляются на ранних стадиях развития, на наш взгляд, характеризуют степень повреждения родительского генома в половых клетках взрослых особей при действии токсикантов, а аномалии, возникающие на стадии гаструлы, свидетельствуют о влиянии металлов и на геном личинок, так как развитие морского ежа до стадии бластулы обеспечивается запасом трофических веществ в яйце, а дальнейшее развитие находится под контролем ядерного аппарата зародыша.

Для выявления возможных механизмов опосредованного действия тяжелых металлов на потомство морских ежей, в модельных экспериментах исследовали активность некоторых ферментов у эмбрионов и личинок, полученных из гамет морских ежей, подвергавшихся действию меди в концентрации 25 мкг/л и действию цинка в концентрации 100 мкг/л в течение 30 сут, а также определяли относительное содержание нуклеиновых кислот, общего белка и нейтральных полисахаридов в первичных мезенхимных клетках гаструл, полученных из гамет животных, подвергавшихся действию меди в концентрации 25 мкг/л и цинка в концентрации 250 мкг/л в течение 16 сут.

Кислая фосфатаза. Активность кислой фосфатазы у потомства морских ежей, содержащихся с цинком, увеличивалась на стадиях

Таблица 3

Эмбриональное и личиночное развитие потомства морских ежей, содержащихся с медью и цинком

Бид	Условия содержания взрослых особей	Стадии развития					
		Токсикант (мкг/л)	Длительность (сут)	Зигота	2-х бластомера	Бластула	Гаструла
<i>S. luscus</i>	Контроль		30	50,0 [±] 8,7	75,0 [±] 3,1	84,6 [±] 2,7	59,3 [±] 7,0
	Медь (25)		30	59,6 [±] 13,7	70,6 [±] 2,7	78,0 [±] 7,8	57,0 [±] 6,1
	Цинк (100)		30	38,3 [±] 6,1	35,6 [±] 9,0 ^x	80,0 [±] 1,1	46,6 [±] 8,0
<i>S. intermedius</i>	Контроль		40	97,7 [±] 0,9	96,6 [±] 1,5	77,0 [±] 1,1	80,0 [±] 1,0
	Медь (5)		40	99,6 [±] 0,3	92,6 [±] 2,8	64,3 [±] 2,4 ^x	44,6 [±] 2,8 ^x
	Цинк (50)		40	92,4 [±] 3,8	73,0 [±] 5,5 ^x	58,6 [±] 4,5 ^x	27,6 [±] 3,2 ^x
<i>S. lntarmedius</i>	Контроль		19	98,3 [±] 0,4	89,6 [±] 1,8	77,0 [±] 1,5	49,3 [±] 2,0
	Медь (25)		19	96,6 [±] 0,8	66,0 [±] 2,0 ^x	51,3 [±] 5,0 ^x	35,3 [±] 2,9 ^x
	Цинк (250)		19	93,6 [±] 2,9	67,0 [±] 1,4 ^x	40,6 [±] 3,8 ^x	27,6 [±] 1,7 ^x

Примечание: x -- P < 0,05. Количество зародышей и личинок выражено в процентах.

зиготы и бластулы и снижалась на стадии гастролы (табл. 4). У потомства морских ежей, содержащихся с медью, активность фермента была повышена на всех исследованных стадиях по сравнению с контролем (табл. 4).

Щелочная фосфатаза. Активность щелочной фосфатазы возрастала у бластул, полученных из гамет морских ежей, содержащихся с цинком, и у плутеусов после воздействия меди на родительских особей (табл. 4).

Глюкозо-6-фосфатаза. Активность глюкозо-6-фосфатазы практически исчезала у гастрол, полученных из гамет морских ежей, содержащихся как с медью, так и с цинком, и восстанавливалась на стадии плутеуса (табл. 4).

Mg²⁺-АТФаза. Активность Mg²⁺-АТФазы у потомства морских ежей, выдерживавшихся с медью, достоверно не отличалось от контрольных значений (табл. 4). Выдерживание взрослых особей в воде с цинком приводило к понижению активности фермента на стадии гастролы и, наоборот, к возрастанию ее почти в три раза у плутеусов (табл. 4).

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы была снижена у гастрол, полученных из гамет морских ежей, содержащихся с медью (табл. 4). У потомства животных, содержащихся с цинком, активность этого фермента также резко подавлялась (табл. 4).

Нуклеиновые кислоты. После выдерживания морских ежей с медью, относительное суммарное содержание нуклеиновых кислот в ядрах первичных мезенхимных клеток гастрол было снижено по сравнению с контрольным значением, и составляло, соответственно, 72,0 ± 1,2 и 89,1 ± 1,6 (P < 0,01). Так как содержание ДНК не изменялось, то снижение содержания нуклеиновых кислот происхо-

Таблица 4

Активность ферментов у потомства морских ежей, содержащихся с медью и цинком

Условия содержания взрослых особей	Стадия развития потомства	Кислая фосфатаза	Щелочная фосфатаза	Глюкозо-6-фосфатаза	Mg ²⁺ -АТФаза	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (нмоль/мин мг белка)
Контроль	1	37,8±1,0	6,4±0,6	7,0±1,6	94,7± 5,0	-
	2	33,1±2,6	6,2±0,5	7,6±0,4	96,6± 5,8	-
	3	36,9±1,0	7,1±0,9	2,0±0,5	79,3± 9,2	39,0±6,6
	4	41,3±3,0	8,5±0,1	1,6±0,4	39,3± 0,4	38,7±0,6
Цинк (100 мкг/л)	1	46,2±1,6 ^{xx}	7,2±0,5	10,5±0,3	107,0± 7,2	-
	2	46,8±2,0 ^x	8,7±0,5 ^x	9,3±0,7	100,6±11,5	-
	3	23,3±2,1 ^{xx}	6,6±0,1	н.в.	31,3± 8,1 ^x	8,7±2,4 ^{xx}
	4	40,9±1,6	9,9±0,7	1,2±0,0	86,6±11,5 ^x	12,2±2,2 ^{xx}
Медь (25 мкг/л)	1	53,4±1,6 ^{xx}	6,5±0,6	II, 4±0,6	103,3± 5,7	-
	2	55,4±3,0 ^{xx}	6,5±0,8	II, 6±0,7 ^{xx}	III, 3± 2,3	-
	3	50,5±0,2 ^{xx}	8,2±0,9	н.в.	70,0±10,0	32,3±1,5 ^x
	4	64,3±0,5 ^{xx}	II, 7±0,8 ^x	I, 9±0,2	55,0± 3,2	47,5±5,0

Примечание: I-зигота, 2-бластула, 3-гастрол, 4-плутеус; н.в. - не выявлено; x - P < 0,05; xx - P < 0,01.

дило за счет РНК. Аналогичная картина наблюдалась в ядрах мезенхимных клеток гаструл после воздействия цинка на родительских особей, содержание ДНК + РНК составляло $77,2 \pm 2,4$.

Уменьшение содержания РНК было отмечено на стадии гастреры в цитоплазме первичных мезенхимных клеток у обеих подопытных групп; оно находилось в пределах $50,0 \pm 1,1$ по сравнению с $58,0 \pm 1,2$ в контроле ($P < 0,01$).

Необходимо отметить, что после воздействия цинка на взрослых особей, на стадии гастреры были обнаружены ядра первичных мезенхимных клеток с гипо- и гипердиплоидным содержанием ДНК (рис. 2). Очевидно, это явление связано с нарушением распределения хромосом при митозе.

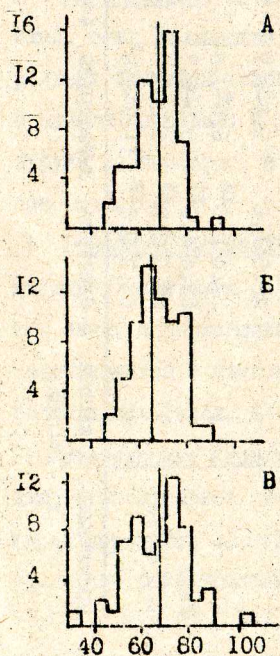


Рис. 2. Содержание ДНК в клетках первичной мезенхимы гастрер, полученных от: А - контрольных, Б - медь-, В - цинк-обработанных взрослых морских ежей. По горизонтали - количество клеток; по вертикали - оптическая плотность вещества.

Общий белок. После выдерживания морских ежей с медью отмечалось снижение относительного содержания общего белка в мезенхимных клетках гастрер до $66,7 \pm 1,0$ ($P < 0,01$), а после воздействия цинка, наоборот, его повышение до $84,4 \pm 1,0$ ($P < 0,01$) по сравнению с контрольным значением $79,4 \pm 1,1$.

Нейтральные полисахариды. Содержание нейтральных полисахаридов в клетках первичной мезенхимы у подопытных и контрольных гастрер статистически не различалось.

Таким образом, наблюдавшиеся аномалии развития эмбрионов и личинок, полученных из гамет морских ежей, содержащихся с медью и цинком, могут быть обусловлены как нарушением функционирования хромосом и белоксинтезирующего аппарата в половых клетках родительских особей, так и изменением активности ферментов и работы генома в развивающихся зародышах.

ВЫВОДЫ

1. Медь и цинк оказывают дозозависимый эффект на развитие и функционирование половой железы морских ежей. Низкие концентрации тяжелых металлов стимулируют рост овоцитов и формирование зрелых яиц в гонаде и замедляют дифференцировку сперматогониев и сперматоцитов. Высокие концентрации металлов угнетают рост овоцитов, приводят к гибели половых клеток у самцов и самок и иницируют фагоцитарную активность вспомогательных клеток гонады. Гибель половых клеток сопровождается компенсаторной реакцией яичников в виде увеличения численности гамет новой генерации, направленной на восстановление структуры и функции органа.

2. Гистопатологические изменения в гонадах морских ежей при действии меди и цинка носят неспецифический характер и затрагивают как половые, так и соматические клетки. В яичниках наблюда-

ется вакуолизация и базофилия цитоплазмы овоцитов, пикноз ядер, зернистая и гидропическая дистрофия гамет, разрушение зрелых яиц. В семенниках изменяется степень конденсации хромосом, происходит поляризация хромосомного материала и разрушение ядерной оболочки сперматоцитов. Во вспомогательных клетках наблюдается расширение канальцев и цистерн эндоплазматического ретикулума. Интенсивность патологических процессов зависит от дозы токсикантов и длительности их воздействия и может носить преходящий характер.

3. Действие меди и цинка на морских ежах в период роста и созревания половых клеток оказывает повреждающий эффект на развитие зародышей, проявляющееся в замедлении или нарушении дробления и гаструляции, возрастании количества аномальных личинок и снижении их жизнеспособности.

4. Выдерживание морских ежей с медью и цинком приводит к изменению активности кислой и щелочной фосфатаз, гликозо-6-фосфатазы, Mg^{2+} -АТФазы и гликозо-6-фосфатдегидрогеназы у эмбрионов и личинок, полученных из гамет подопытных животных.

5. Выдерживание морских ежей в период гаметогенеза с медью и цинком влияет на синтетические процессы у эмбрионов: в первичных мезенхимных клетках гаструл изменяется содержание РНК и общего белка. Цинк оказывает повреждающее действие на геном личинок, приводя к появлению у гаструл первичных мезенхимных клеток с гипо- и гипердиплоидным содержанием ДНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дуркина В.Б., Гнездилова С.М. Влияние различных концентраций кадмия на эмбрионы и личинки морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Онтогенез. 1985. № 3. С. 294-298.

2. Гнездилова С.М., Липина И.Г., Дуркина В.Б., Карасева Е.М. Нарушение репродукции морских ежей и мидий при загрязнении среды кадмием // IV Всесоюзная конференция по промышленным беспозвоночным (тезисы докладов). Ч.2. Севастополь, апрель 1986. М.: 1986. С. 330-331.
3. Дуркина В.Б., Бельчева Н.Н., Евтушенко З.С. Изменение процессов развития эмбрионов морского ежа при действии меди и цинка // Микроэлементы в биологии и их применение в медицине и сельском хозяйстве. Тезисы докладов X Всесоюзной научной конференции. Т.3. Чебоксары, 1986. С. 88-89.
4. Ващенко М.А., Дуркина В.Б., Гнездилова С.М. Влияние углеводородов дизельного топлива и кадмия на развитие потомства морских ежей // Онтогенез. 1988. № 1. С. 82-88.
5. Гнездилова С.М., Сябина И.Г., Ващенко М.А., Дуркина В.Б., Карасева Е.М. Действие токсических веществ на репродуктивную функцию иглокожих и двустворчатых моллюсков // V Всесоюзная конференция по водной токсикологии (тезисы докладов). Одесса, 18-22 апреля 1986. М.: 1988. С. 109.
6. Дуркина В.Б. Изменение репродуктивных показателей морских ежей в ответ на воздействие сублетальных концентраций меди и цинка // Симпозиум по онтогенезу морских беспозвоночных. Тезисы докладов III Всесоюзной конференции по морской биологии (Севастополь, 18-20 октября 1988). Владивосток, 1988. С. 30.
7. Гнездилова С.М., Липина И.Г., Дуркина В.Б., Буровина И.В., Уханов К.Ю. Содержание кадмия в гонаде морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и его действие на гаметы и потомство // Биология моря. 1988. № 2. С. 46-51.

8. Durkina V.B., Evtushenko Z.S. Changes in activity of certain enzymes in sea urchin embryos and larvae after exposure of adult organisms to heavy metals // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1991. V. 72. P. 111-115.
9. Сясина И.Г., Ващенко М.А., Дуркина В.Б. Гистопатологические изменения гонад морских ежей при действии тяжелых металлов // Биология моря. 1991. № 4.



Дуркина Валентина Борисовна

Автореферат

ВЛИЕНИЕ МЕДИ И ЦИНКА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ
И РАННИЙ ОНТОГЕНЕЗ МОРСКИХ ЕЖЕЙ.

Подписано к печати 19. 05.92г. Формат 60/84/16.

Печать офсетная. Усл.п.л.1,16.Уч.-изд.л.0,8.

Тираж 100 экз. Заказ 51. Бесплатно.

Отпечатано в офсетно-ротапринтном цехе издательства
"Дальнаука", 690600 Владивосток, Ленинская, 50.