

УДК 577.472 : 539.16+597—13+597.553.2+597.581.1

**ВЛИЯНИЕ РАСТВОРЕННЫХ В ВОДЕ РАДИОИЗОТОПОВ  
НА РАЗВИВАЮЩУЮСЯ ИКРУ РЫБ**И. А. ШЕХАНОВА, В. С. БЕЛЬМАКОВ, В. И. ЛАПИН, А. Г. ЛЯШЕНКО  
Г. К. МИЛОРАДОВ

В результате способности икры рыб в период эмбрионального развития усваивать растворенные в воде вещества в ней накапливаются наряду с биогенными элементами искусственнорадиоактивные изотопы, которые уже в настоящее время приобрели характер постоянно действующего радиоэкологического фактора в водных массах земной поверхности. Аккумуляция радиоактивных веществ в икре создает дополнительный источник внутреннего облучения развивающегося эмбриона к внешнему облучению радиоактивногрязной водой. Изучение влияния облучения на икру рыб, развитие которой происходит в радиоактивных растворах, имеет и теоретическое и практическое значение. Теоретический интерес заключается в том, что в литературе чрезвычайно мало работ, посвященных хроническому действию на организм инкорпорированных радиоизотопов. В то же время совершенно очевидно, что их действие не тождественно действию разового внешнего облучения. Накопление фактического материала по воздействию на рыб радиоактивного загрязнения водной среды позволит в дальнейшем вносить соответствующую поправку при составлении прогнозов уловов и определении динамики численности рыб, что имеет практическое значение.

Целью настоящей работы было в экспериментальных условиях изучить влияние растворенных в воде радиоизотопов на некоторые стороны жизнедеятельности икры рыб в процессе эмбриогенеза.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА**

Опыты проводили с икрой бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pall), радужной форели (*Salmo irrideus* Gibbons) и горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha* Walb).

Подбирая объекты для первого этапа исследований, мы, прежде всего, пытались при проведении опытов исключить все моменты, влияющие на нормальный процесс развития, и создать условия инкубации, близкие к оптимальным, чтобы иметь уверенность, что появляющиеся в опыте аномалии обусловлены только используемым нами фактором воздействия излучений вносимых в воду радиоизотопов.

Условия же инкубации икры форели и горбуши в искусственных условиях изучены довольно полно, а опыт инкубации икры бычка-кругляка нам передали сотрудники ИМЖ АН СССР. Кроме того, у горбуши и бычка-кругляка рано закладываются и дифференцируются половые железы, а исследование влияния радиации на этот процесс также представляет несомненный интерес.

Икра горбуши была получена на Южном Сахалине на Анивском рыболовном заводе, икра форели — в Чернореченском форелевом хозяйстве. Икру брали от нескольких самок и оплодотворяли спермой от нескольких самцов. В изотермическом ящике сразу после набухания икру доставляли в Москву. Опыты с икрой форели и горбуши проводили в аквариальной ВНИРО. По 1000—1100 икринок форели или 400—500 икринок горбуши на рамках из органического стекла с капроновым газом помещали в эмалированные кюветы высотой 3 см и площадью 500 см<sup>2</sup>, в которые по капиллярам подавались растворы со скоростью около 5 л в сутки. Средняя температура воды во время опыта была около 8° С.

Работу с икрой бычка-кругляка проводили на Азовском море на косе Обиточной. В отделенные от моря лиманы, освобожденные от посторонней рыбы, сажали производителей бычка-кругляка и ставили гнезда из черепиц. Бычки откладывали икру, приклеивая ее ко внутренней поверхности черепиц. По мере появления икры на черепицах ее использовали в опыте. Было установлено, что на черепицах инкубировать икру нельзя, так как в микроразностях получается замор, и икра гибнет. Поэтому осторожно пинцетом ее снимали с субстрата и размещали в эмалированные миски, в которых проводили опыты. Смену растворов производили 2 раза в сутки, используя профильтрованную морскую воду. Соленость воды была около 12‰. Опытные сосуды для защиты от лучей солнца поместили под навесом. Средняя температура воды в период инкубации икры бычка-кругляка была 20—22° С.

В опыте икра находилась от стадии бластулы до выклева. Развитие икры бычка-кругляка шло 15 дней, форели — 35 дней, горбуши — 60—70 дней.

Изучали влияние на развитие икры стронция-90 — иттрия-90 в концентрациях  $5-7 \cdot 10^{-11}$  кюри/л,  $2,5-3 \cdot 10^{-9}$  кюри/л,  $2-2,5 \cdot 10^{-7}$  кюри/л и стронция-89 в концентрациях  $4-5 \cdot 10^{-9}$  кюри/л,  $3,5-4 \cdot 10^{-7}$  кюри/л,  $4-5 \cdot 10^{-5}$  кюри/л. Предельно допустимыми концентрациями (ПДК) загрязнения воды для человека являются для стронция-90 — иттрия-90  $3 \cdot 10^{-11}$  кюри/л, для стронция-89  $3 \cdot 10^{-9}$  кюри/л [6]. Таким образом, применяемые в опытах самые низкие концентрации радиоизотопов были близкими к ПДК.

Все радиоактивные препараты использовали в виде водорастворимых хлористых соединений. Препараты стронция стабильного носителя не имели.

Проводя экспериментальную инкубацию, мы стремились охватить и более широкий круг вопросов, чем появление под влиянием радиации морфологических аномалий или увеличение смертности. В процессе эксперимента систематически фиксировали пробы опытной и контрольной икры для гистологического исследования половых желез, печени, почек, селезенки и других органов. Этот материал обрабатывается А. Д. Шишаниной. Изучали влияние радиоизотопов на нуклеиновые кислоты, кроветворение, общий обмен веществ.

Определения содержания нуклеиновых кислот в икре были выполнены В. И. Лапиным, изучение обмена проводил Г. К. Милорадов, содержание гемоглобина исследовали А. Г. Ляшенко и В. С. Бельмаков, морфологические исследования проводили К. И. Москалькова и В. С. Бельмаков. И. А. Шеханова проводила радиометрические исследования и руководила всеми работами.

В этом разделе дана методика постановки опыта и проведения инкубации, методики же проведения различных исследований будут подробно описаны в соответствующих разделах.

Статистическую обработку полученного материала проводили методом Стьюдента [11, 12]. За помощь и консультации при обработке материала выражаем сердечную благодарность М. П. Аронову.

### СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты в биологическом отношении являются одними из важнейших веществ. Они не только участвуют в построении протоплазмы и ее органоидов, но имеют самое непосредственное отношение к различным звеньям обмена веществ. Они играют важную роль в процессах размножения, роста и в биосинтезе белков. Нуклеиновые кислоты обладают специфичностью; кроме того, многочисленные факты свидетельствуют об их участии в процессах наследственности. Поэтому наиболее важным является всестороннее исследование нуклеиновых кислот в процессе эмбрионального развития животных.

Выяснено, что количество ДНК является важнейшим фактором для определения числа клеток в организме и показателем процессов роста [13]. Но содержание ДНК в клетках подвержено очень слабым колебаниям [1, 4, 15]. В противоположность ДНК содержание РНК в клетках подвержено очень сильным изменениям [2, 3, 4, 7, 10, 15]. Количество РНК меняется от типа клеток и ткани, а также возраста и физиологического состояния. В больших количествах РНК скопляется в зародышевых тканях. Молодые, быстро размножающиеся и растущие клетки характеризуются высоким содержанием РНК, так как РНК имеет прямое отношение ко всем процессам, связанным с синтезом белка.

Среди процессов деления клеток и обмена веществ нуклеинокислотный обмен считается наиболее чувствительным к действию радиации. Однако данных по влиянию малых доз радиации инкорпорированных радиоизотопов на развивающийся эмбрион нет. В то же время весьма вероятно, что биологическое действие радиации инкорпорированных в биосубстрате радиоактивных веществ сможет проявиться при гораздо меньших дозах, чем при внешнем облучении.

Определение нуклеиновых кислот проводили в икре горбуши и бычка-кругляка после инкубации их в растворах стронция-89 щелочным методом Шмидта — Таннхаузера [14], основанным на дифференциальной экстракции ДНК и РНК. Разделение нуклеиновых кислот в щелочном гидролизате (фракция 3, см. схему на рис. 1) основано на различном отношении этих кислот к действию щелочи. Это объясняется отсутствием у ДНК гидроксила у второго атома углерода в рибозе. При подкислении гидролизата ДНК переходит в осадок (фракция 4), а РНК расщепляется до мононуклеотидов в растворе (фракция 5). Определение РНК производили на спектрофотометре по поглощению нуклеотидов в области 260 м $\mu$ . Трихлоруксусная кислота здесь должна быть заменена хлорной кислотой, так как она поглощает в ультрафиолетовой области. ДНК в этом методе экстрагируется горячей хлорной кислотой.

Пробы фиксировали 96°-ным спиртом в отношении 1:9 (9 г спирта на 1 г икры) и сохраняли в нем до начала обработки. При обработке ткань измельчали в фарфоровой ступке, затем в агатовой ступке обрабатывали несколькими порциями 90°-ного спирта, экстрагировали по 2—3 раза смесью спирт — эфир (1:1) и эфиром для удаления пигментов и свободных липидов. Материал высушивали при температуре минус 30—40° С в вакуум-термостате и сохраняли в бюксах с хорошо притертыми крышками при комнатной температуре.

Для количественного определения нуклеиновых кислот брали две параллельные пробы по 100 мг из каждой фиксации. Обработку мате-

риала проводили по схеме, представленной на рис. 1. Отделение осадков от надосадочной жидкости производили на центрифуге с охлаждением ЦЛР-1. Обезжиренную пробу помещали в центрифужные стаканчики и троекратно отмывали от кислоторастворимых соединений порциями по 5—7 мл охлажденным 1,5%-ным раствором хлорной кислоты ( $\text{HClO}_4$ ). Отмывание кислоторастворимых соединений проводили суспензированием массы пробы в 1,5%-ном растворе хлорной кислоты и последующим центрифугированием строго по холоду при температуре

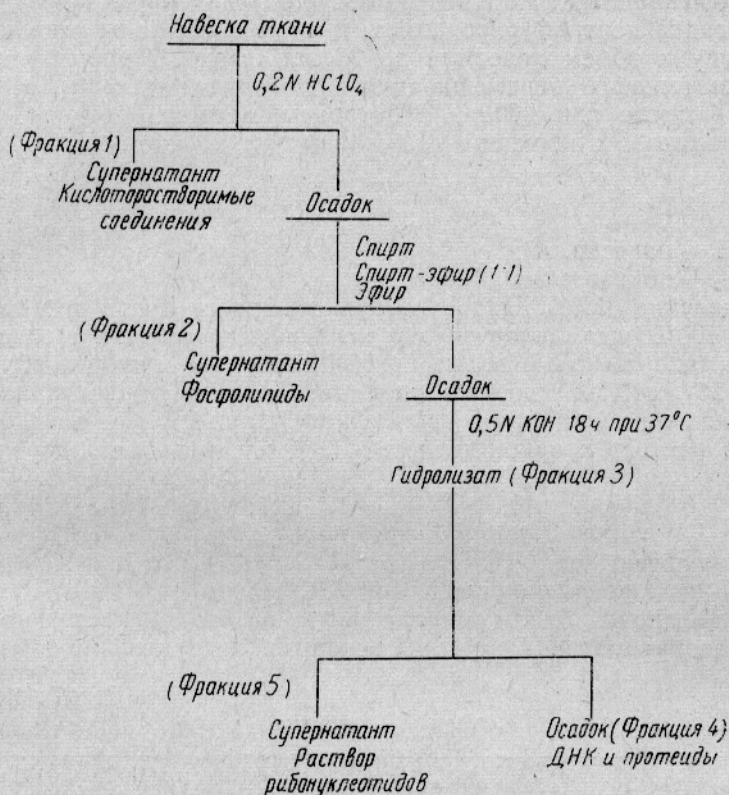


Рис. 1. Схема фракционирования нуклеиновых кислот (метод Шмидта — Танигаузера).

$0+4^{\circ}$  в течение 10—15 мин при 2000—4000 об/мин. Надосадочную жидкость отбрасывали. Продолжительность кислотной обработки не превышала 1,5 ч. После этого для наиболее полного извлечения липидов и пигментов материал промывали 2 раза охлажденным спиртом, несколько раз спиртом, смесью спирт—эфир (1:1) и эфиром при комнатной температуре.

Затем высушенный материал заливали 0,75 N раствором КОН, тщательно размешивали и помещали на 18 ч в термостат при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . После гидролиза суспензию охлаждали до  $0^{\circ}$  и нейтрализовали по лакмусу добавлением по каплям 42%-ной хлорной кислоты до конечной концентрации 1—2%. Смесь при этом интенсивно перемешивали, чтобы избежать сильного местного переокисления, и центрифугировали 15—20 мин при 3000—5000 об/мин на холоду. Надосадочную жидкость, содержащую рибонуклеотиды, отделяли от осадка, сливали в мерную посуду, дважды промывали холодным 1,5%-ным раствором хлорной

кислоты. Промывные воды также сливали в мерную посуду. Осадок высушивали спиртом, смесью спирт—эфир (1:1) и эфиром. Из осадка ДНК экстрагировали 0,5 N хлорной кислотой при температурах 70°, 90° и 100°. В этих условиях ДНК переходила в надосадочную жидкость, которую сливали в мерную посуду, промывали осадок, а промывные воды также сливали в мерную посуду. Затем определяли РНК и ДНК на спектрофотометре СФ-4. Определение РНК и ДНК ведется в ультрафиолете при длинах волн 260 и 270 мμ.

**Определение РНК.** Подкисленный гидролизат (фракция 5), отделенный от осадка центрифугированием, и промывные воды сливали в мерную посуду и объем доводили до 25 мл 1,5%-ной хлорной кислотой. После тщательного перемешивания определяли поглощение раствора в ультрафиолете при 260 мμ. Контролем служил 1,5%-ный раствор хлорной кислоты. Количество РНК вычисляли по формуле:

$$\frac{E_{260} \cdot \text{разведение}}{0,348M} 10,6,$$

где  $M$  — навеска, мг;  
 $E_{260}$  — показатель прибора.

**Определение ДНК.** Надосадочную жидкость после гидролиза при 70; 90 и 100° отделяли от осадка центрифугированием. Надосадочную жидкость и промывные воды сливали в мерную посуду и объем доводили до 25 мл 0,5 N хлорной кислотой. После перемешивания определяли поглощение раствора в ультрафиолете при 270 мμ. Контролем служил 0,5 N раствор хлорной кислоты. ДНК рассчитывали по формуле:

$$\frac{E_{270} \cdot \text{разведение}}{0,283M} 10,1,$$

где  $M$  — навеска, мг;  
 $E_{270}$  — показатель прибора.

Икру на анализ брали в конце опыта на стадии печеночно-желточного кровообращения. Полученные данные приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Варианты опыта	мг на 100 мг сухого вещества		Среднее $\bar{x} \pm S\bar{x}$	$t^*$	$p^*$
	I	II			
<b>Горбуша</b>					
Контроль	1,275	1,517	$1,396 \pm 0,1225$	—	—
$4-5 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	1,561	1,722	$1,641 \pm 0,0245$	1,68	>0,2
$3,5-4 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	1,472	1,474	$1,473 \pm 0,02236$	0,61	>0,6
$4-5 \cdot 10^{-5}$ кюри/л	1,276	1,338	$1,307 \pm 0,0100$	0,70	>0,5
<b>Бычок-кругляк</b>					
Контроль	2,454	2,498	$2,476 \pm 0,02236$	—	—
$4-5 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	2,588	2,500	$2,544 \pm 0,04475$	1,36	>0,4
$3,5-4 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	2,361	2,444	$2,402 \pm 0,0387$	1,65	>0,3
$4-5 \cdot 10^{-5}$ кюри/л	2,373	2,302	$2,337 \pm 0,010$	3,58	>0,05

\* Сравнение данных отдельных вариантов опыта с контрольными.

Таблица 2

## Содержание РНК

Варианты опыта	мг на 100 г сухого вещества		Среднее $\bar{x} \pm Sx$	t*	P*
	I	II			
Горбуша					
Контроль	4,489	5,485	4,987 ± 0,543	—	—
4—5·10 <sup>-9</sup> кюри/л	9,140	8,376	8,759 ± 0,568	4,83	< 0,05
3,5—4·10 <sup>-7</sup> кюри/л	6,244	6,855	6,549 ± 0,1732	1,9	> 0,1
4—5·10 <sup>-5</sup> кюри/л	4,288	4,600	4,444 ± 0,1549	0,9	> 0,4
Бычок-кругляк					
Контроль	11,870	11,577	11,723 ± 0,1284	—	—
4—5·10 <sup>-9</sup> кюри/л	13,770	14,010	13,890 ± 0,489	4,33	< 0,05
3,5—4·10 <sup>-7</sup> кюри/л	12,490	12,790	12,640 ± 0,150	3,04	> 0,05
4—5·10 <sup>-5</sup> кюри/л	11,575	11,577	11,576 ± 0,0158	1,07	> 0,30

\* Сравнение данных отдельных вариантов опыта с контрольными.

Инкубация икры бычка-кругляка и горбуши в растворах с разной концентрацией стронция-89 почти не влияет на изменение количества ДНК, и отклонение его в контроле можно считать ошибкой. Статистическая обработка материала показала, что отличия в содержании ДНК в опытной икре по сравнению с контрольной не достоверны ( $P > 0,05$ ).

В противоположность ДНК количество РНК, по-видимому, подвержено воздействию стронция-89. При развитии икры в растворах с концентрацией 3,5—4·10<sup>-7</sup> и 4—5·10<sup>-9</sup> кюри/л наблюдалось увеличение содержания РНК в опытной икре по сравнению с контрольной. В средней концентрации эти различия статистически недостоверны ( $P > 0,05$ ), а в самой низкой концентрации 4—5·10<sup>-9</sup> кюри/л они существенны и статистически достоверны ( $P < 0,05$ ).

## ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБЩЕГО ОБМЕНА

Показателем уровня обмена служит интенсивность потребления кислорода [5], которую мы и взяли за основу при изучении влияния радиоизлучений на обмен у опытной икры. Особенно резких отклонений в интенсивности обмена трудно было ожидать, так как общее рентгеновское облучение теплокровных животных (мышей, крыс, морских свинок) в дозах до 1000 p не влияет на величину потребления кислорода. Дозы свыше 10 000 p вызывают прогрессивное увеличение потребления кислорода, или резкое снижение интенсивности дыхания, т. е. значительные нарушения. В наших опытах развивающиеся эмбрионы получали, конечно, гораздо меньшую дозу, чем те, которые применялись при внешнем облучении, но интересно было изучить действие радиации инкорпорированных в биосубстрате радиоактивных веществ на уровень обмена в развивающемся эмбрионе.

Опыты по изучению интенсивности потребления кислорода икрой бычка-кругляка при инкубации ее в растворах стронция-90 — иттрия-90 проводили в специально созданном приборе, изображенном на рис. 2.

Опытную икру на время инкубации помещали в респираторную камеру 5, которая представляет собой сосуд из органического стекла объемом 70 мл. Сосуд состоит из двух плотно прилегающих частей. Для достижения абсолютной герметизации между соединительными краями сосуда прокладывали кольцо из резины. Нижнюю часть респираторного сосуда заполняли мелкой галькой или стеклянными бусинами, на которые в один слой помещали опытную икру. Галька или бусины способствовали равномерному распределению поступающей снизу воды по всему объему респираторного сосуда. Прозрачные стенки сосуда позволяли наблюдать за состоянием икры. При появлении погибших

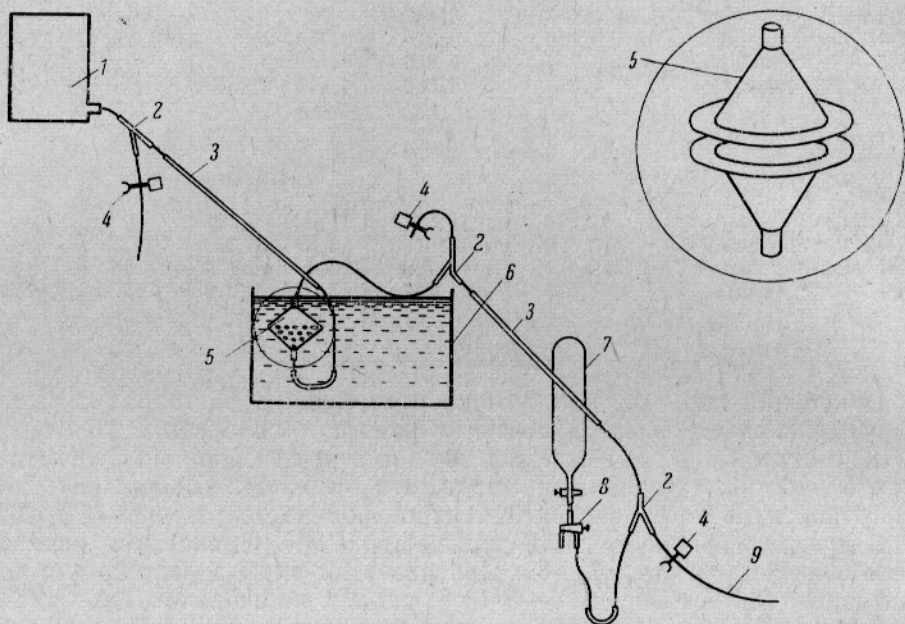


Рис. 2. Прибор для изучения интенсивности потребления кислорода развивающейся икрой:

1 — сосуд с водой (бутыль), 2 — тройник, 3 — манометрическая трубка, 4 — зажим, 5 — респиратор, 6 — термостат, 7 — воронка, 8 — двухходовой кран, 9 — сток в катионит.

икринок верхнюю часть сосуда поднимали и мертвую икру удаляли. Пузырьки воздуха, образующиеся при заполнении сосуда водой, удалялись через тройник 2. Отфильтрованная морская вода в респираторный сосуд подавалась из бутылки 1 с нижним тубусом по манометрической трубке 3 диаметром 0,5 мм и длиной 80 см. Манометрическую трубку использовали для создания определенной скорости тока в приборе. В наших опытах скорость тока составляла около 4 л/сутки (с колебаниями от 3,5 до 4,5 л/сутки в разных приборах). Из респираторного сосуда вода по дополнительной манометрической трубке поступала в делительную воронку 7 и собиралась под слоем вазелинового масла, препятствующего обогащению ее кислородом из окружающей среды. Из воронки по мере необходимости через двухходовой кран 9 отбирали пробы воды для определения содержания кислорода. Респираторные сосуды помещали в термостат 6 — аквариум, наполненный водой для создания стабильной температуры во всех вариантах опыта в период инкубации. Пробу воды для определения исходного содержания кислорода брали из бутылки 1 через тройник 2. Уровень потребления кисло-

Таблица 3

Потребление кислорода икрой бычка-кругляка  
(в мг/ч на 100 икринок)

Дни инку- бации	Контроль	Концентрация Sr-90 — Y-90 в кюри/л		
		$5-7 \cdot 10^{-11}$	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$
1	0,1828	0,1551	0,1642	0,1906
2	0,2605	0,1551	0,1828	0,3003
3	0,4389	0,2668	0,2435	0,3508
4	0,3215	0,2210	0,2721	0,2275
5	0,3431	0,2225	0,2631	0,2733
6	0,3187	0,3938	0,3055	0,2749
7	0,4653	0,4091	0,2528	0,2354
8	0,3546	0,4468	0,3360	0,4552
9	0,5353	0,5497	0,3323	0,3228
10	0,4546	0,6441	0,3397	0,4005
11	0,4698	0,6051	0,5793	0,5054
12	0,6640	1,057	1,085	0,6518
Коэффициент регрессии	0,0345	0,0722	0,0523	0,0352
<i>t</i>		3,8	1,5	0,007
<i>P</i> *		<0,01	>0,1	>0,4

\* Сравнение данных отдельных вариантов с контрольными.

рода определяли по разности содержания кислорода в воде до респирационной камеры и после. При расчете количества потребленного опытной икрой кислорода учитывали скорость тока воды в респирацион-

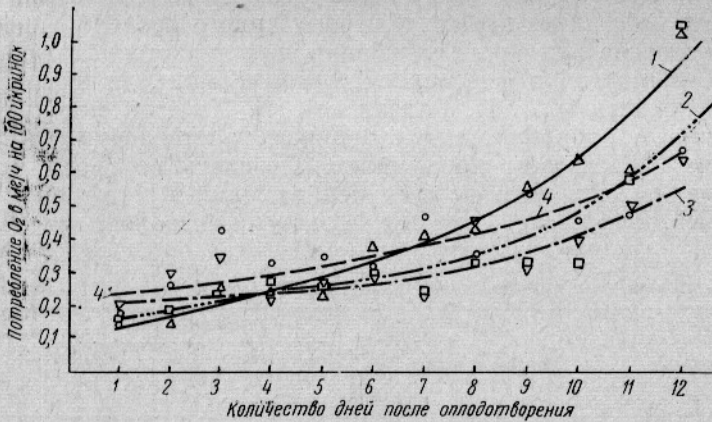


Рис. 3. Потребление кислорода икрой бычка-кругляка при инкубации в растворах стронция-90 — иттрия-90 различной концентрации (кюри/л):

1 —  $5 \cdot 10^{-11}$ ; 2 —  $5 \cdot 10^{-9}$ ; 3 —  $5 \cdot 10^{-7}$ ; 4 — контроль.

ных сосудах. Интенсивность потребления кислорода, характеризующую уровень общего обмена развивающейся икры, выражали количеством потребленного кислорода в мг/ч на 100 икринок. Преимущество примененного в опытах прибора заключается в том, что икра в течение всего периода развития находится в стабильных условиях и не травмируется. Таким образом, можно избежать многих привходящих моментов при



определении интенсивности потребления кислорода. Полученные данные приведены в табл. 3.

Из рис. 3 видно, что на первых стадиях развития икры потребление кислорода в опытных и контрольных партиях примерно одинаково. Начиная со второго периода инкубации, примерно со стадии эритроцитарного кровообращения, интенсивность обмена икры, развитие которой идет в самой низкой концентрации, возрастает по сравнению с контролем, обмен же в концентрации  $4-5 \cdot 10^{-7}$  кюри/л угнетен. Статистическая обработка полученных данных показывает, что интенсивность потребления кислорода икрой, инкубировавшейся в концентрации стронция-90 — иттрия-90  $4-5 \cdot 10^{-11}$  кюри/л, существенно и достоверно ( $t=3,8$ ,  $P<0,01$ ) отличается от контрольных данных. В более высоких концентрациях статистического различия установить пока не удалось ( $t_{-9}$  к контролю  $=1,5$   $P>0,1$ ;  $t_{-7}$  к контролю  $=0,07$   $P>0,4$ ). Таким образом, и по интенсивности потребления кислорода, как и по содержанию РНК, показатели в самой низкой концентрации достоверно выше, чем в контроле. Инкорпорированные в биосубстрате радиоизотопы при таких маленьких концентрациях оказывают влияние на уровень потребления кислорода.

#### СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ЭМБРИОНОВ

Лучевая интоксикация организма проявляется наряду с другими показателями в изменении картины крови. Снижается количество лейкоцитов в периферической крови — развивается лейкопения; наблюдаются последовательные изменения со стороны красной крови: исчезают ретикулоциты, за счет уменьшения числа эритроцитов и снижения содержания гемоглобина развивается анемия. При хроническом инкорпорированном облучении малыми дозами эти явления развиваются постепенно.

Изучали содержание гемоглобина у эмбрионов горбуши и радужной форели на стадиях начала эритроцитарного кровообращения, перед выклевом и после окончания инкубации икры в растворах стронция-90 — иттрия-90. Гемоглобин определяли микрометодом, модифицированным П. А. Коржуевым и Л. И. Радзинской [8]. По этой методике раствор гемоглобина обрабатывается резорцином, растворенным в пиридине, и спиртовым раствором пирамидона. Перекись водорода окрашивает полученную смесь в голубой цвет, переходящий в устойчивый розовато-карминовый. Длительное сохранение окраски позволяет проводить коло-

Таблица 4

Содержание гемоглобина у радужной форели (по данным А. Г. Ляшенко)

Стадии развития	Варианты опыта	Гемоглобин		$t^*$	$P^*$
		в условных единицах $\bar{x} \pm S\bar{x}$	в %		
Эритроцитарное кровообращение	Контроль	39,40 ± 5,15	100	—	—
	$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	89,86 ± 10,8	228	2,92	0,02
	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	50,7 ± 4,85	118,1	1,75	0,1
	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	78,5 ± 5,35	119,5	5,75	0,001
В день выклева	Контроль	68,4 ± 4,7	100	—	—
	$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	56,0 ± 4,74	81,8	1,85	0,1
	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	51,7 ± 3,5	75,7	2,88	0,02
	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	45,5 ± 7,4	66,5	2,49	0,05

\* Сравнение данных отдельных вариантов опыта с контрольными.

риметрирование малых концентраций гемоглобина около 1 мг% при ошибке до 5%. При использовании этой методики определение можно вести в малых объемах биологических жидкостей в 1 мм<sup>3</sup>, что позволяет определять количество гемоглобина у одной личинки.

Исследуемую икринку или личинку помещали в пробирку и тщательно растирали стеклянной палочкой с раствором пирамидона, резорцина и пиридина. В гомогенную смесь добавляли остальные реактивы и оставляли до получения устойчивой окраски. Через 45 мин пробы центрифугировали и центрифугат колориметрировали на фотоэлектроколориметре ФЭК-М при зеленом светофильтре. Количество гемоглобина выражали в условных единицах на один исследованный экземпляр (табл. 4).

Из табл. 4 видно, что сразу после появления гемоглобина количество его в опытной икре форели значительно выше, чем в контрольной. Это еще раз говорит о повышении процессов жизнедеятельности у подопытных животных на первой стадии воздействия радиации [9]. В конце эмбрионального развития перед выклевом картина меняется — на смену псевдостимуляции приходит угнетение кроветворения и количество гемоглобина у опытных эмбрионов форели становится ниже, чем у контрольных (рис. 4).

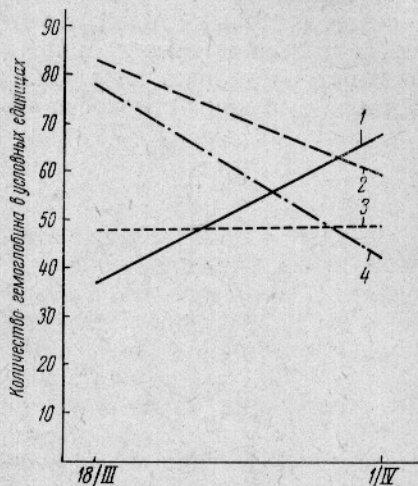


Рис. 4. Содержание гемоглобина у эмбрионов радужной форели при инкубации в растворах стронция-90 — иттрия-90 различной концентрации (кюри/л):

1 — контроль; 2 —  $5 \cdot 10^{-11}$ ; 3 —  $5 \cdot 10^{-9}$ ; 4 —  $5 \cdot 10^{-7}$ .

Таблица 5

Содержание гемоглобина у горбуши (по данным В. С. Бельмакова)

Возраст личинок в сутках	Варианты опыта	Гемоглобин		t*	p*
		в условных единицах $\bar{x} \pm Sx$	в %		
1	Контроль	239 ± 24	100		
	$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	185 ± 14	77,4	1,985	>0,05
	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	164 ± 10	68,6	2,862	<0,02
	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	156 ± 6	65,3	3,32	<0,01
8	Контроль	336 ± 33	100		
	$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	217 ± 11,4	64,6	3,574	<0,01
	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	239 ± 16	71,1	2,694	<0,05
	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	216 ± 26,5	64,3	3,05	<0,02
16	Контроль	277 ± 16,0	100		
	$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	220 ± 13,8	79,4	2,663	<0,05
	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	218 ± 16,7	78,7	2,543	<0,05
	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	240 ± 22	86,6	1,36	>0,02
24	Контроль	395 ± 20	100		
	$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	277 ± 14,8	70,1	4,645	<0,001
	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	304 ± 15,5	77	3,527	<0,01
	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	327 ± 25	82,5	2,118	>0,05

\* Сравнение данных отдельных вариантов опыта с контрольными.

У однодневных личинок горбуши (табл. 5) после инкубации икры в радиоактивных растворах содержание гемоглобина выше, чем у опытных.

После выклева личинки горбуши были перенесены в аквариумы с чистой проточной водой. По мере выращивания проводили исследования содержания гемоглобина, изучая последствия развития в радиоактивных растворах. Было обнаружено, что после инкубации икры в растворе высокой активности ( $2-2,5 \cdot 10^{-7}$  кюри/л) наблюдается восста-

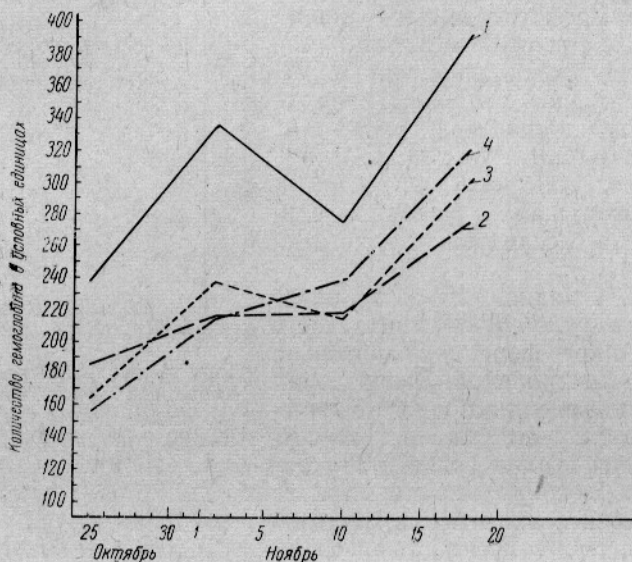


Рис. 5. Содержание гемоглобина у личинок горбуши при инкубации в растворах стронция-90—иттрия-90 различной концентрации. Условные обозначения те же, что на рис. 4.

новление процесса кроветворения и количество гемоглобина постепенно возрастает, приближаясь к контрольному (рис. 5). У личинок же из самой низкой, близкой к предельно допустимой концентрации ( $5-7 \cdot 10^{-11}$  кюри/л) процесса восстановления не наблюдается, и количество гемоглобина достоверно ниже, чем в контроле.

#### МОРФОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ИКРЫ

Морфологию развития икры изучали в течение всего эмбрионального периода. На исследование брали живую икру и фиксированную в 4%-ном формалине с добавлением поваренной соли. В опытах с икрой бычка-кругляка пробы просматривали ежедневно, форель и горбушу исследовали через каждые пять дней инкубации. Было установлено, что при инкубации икры в растворах стронция-90—иттрия-90 разной концентрации с повышением концентрации раствора у горбуши и радужной форели наблюдается некоторое увеличение числа особей, имеющих различные морфологические аномалии. В опытах с бычком-кругляком этого установить не удалось (табл. 6). Несмотря на то что увеличение весьма незначительно и статистически недостоверно, все же нельзя не упомянуть о нем.

Характер уродств и в опытных и в контрольных партиях был сходным, нарушения наблюдались как в отдельных системах органов, так

Таблица 6

Количество зародышей с морфологическими аномалиями (%)

Объект исследования	Контроль	Концентрация Sr-90 — Y-90 в кюри/л		
		$5-7 \cdot 10^{-11}$	$2,5-3 \cdot 10^{-9}$	$2-2,5 \cdot 10^{-7}$
Бычок-кругляк . . . . .	8,5	6,0	7,0	1,6
Радужная форель . . . . .	0	0	2,2	4,4
Горбуша . . . . .	8	4,4	11,1	12

и в целых отделах тела вплоть до их полной редукции. Глубина же развития уродств у каждой аномальной особи увеличивалась с увеличением концентрации растворов. Наиболее часто в опытных партиях встречались эмбрионы с уродливым строением глаз. Глаза были недоразвиты, имели неправильную форму в виде черных фигурных образований, были редуцированы полностью или частично.

Визуальные наблюдения показали, что и в темпе развития сказывается действие радиации: при инкубации икры в  $2,5-3 \cdot 10^{-9}$  кюри/л и особенно  $2-2,5 \cdot 10^{-7}$  кюри/л наблюдалась некоторая задержка в развитии, эмбрионы с запозданием переходили на следующие этапы, однако выклев во всех вариантах опыта проходил одновременно.

О влиянии на выживаемость икры судили по суммарному отходу ее за время инкубации. Осредненные данные по двум параллельным опытам приведены в табл. 7.

Таблица 7

Отход икры за время инкубации

Объект исследования	Изотоп	Варианты опыта	Количество икринок (в шт.)		Процент отхода
			начальное	погибло	
Радужная форель	Стронций-89	Контроль	688	101	14,6
		$4,5-5 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	583	79	13,6
		$3,5-4 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	548	94	17,0
		$4-5 \cdot 10^{-5}$ кюри/л	579	75	13,1
	Стронций-90 — иттрий-90	Контроль	1054	120	11,0
		$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	1065	111	10,4
		$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	1185	137	11,6
		$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	1022	110	10,8
Бычок-кругляк	Стронций-90 — иттрий-90	Контроль	450	73	16,0
		$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	450	64	14,0
		$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	450	14	31,0
		$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	450	50	11,0
Горбуша	Стронций-90 — иттрий-90	Контроль	599	173	28,8
		$5-7 \cdot 10^{-11}$ кюри/л	480	169	35,2
		$2,5-3 \cdot 10^{-9}$ кюри/л	541	161	29,7
		$2-2,5 \cdot 10^{-7}$ кюри/л	622	137	22,0

Видно, что увеличения гибели икры в период эмбрионального развития ее в радиоактивных растворах испытанных концентраций не наблюдается. Отход в процентах к общему количеству икры, бывшей в опыте, и в опытных, и в контрольной партиях примерно одинаков.

Однако дальнейшее выращивание личинок форели после инкубации икры в растворах стронция-90 — иттрия-90 показало, что опытные эмбрионы все-таки менее жизнестойки, чем контрольные (табл. 8).

Таблица 8

Отход личинок форели за время выращивания

Варианты опыта	Количество личинок (в шт.)		Процент отхода
	посажено	погибло	
Контроль	23	3	13,0
5—7·10 <sup>-11</sup> кюри/л	17	4	23,5
2,5—3·10 <sup>-9</sup> кюри/л	17	6	35,3
2—2,5·10 <sup>-7</sup> кюри/л	21	21	100,0

Выключившихся личинок поместили в кристаллизаторы с чистой отстойной водопроводной водой и выращивали в течение 30 суток. У личинок за это время рассосался желточный мешок, и они перешли на активное питание. Кормом им служили резаные олигохеты и личинки хирономид.

Из табл. 8 видно, что с увеличением концентрации растворов, в которых проходила инкубация икры, снижается выживаемость выключившихся личинок. Основной отход был при переходе личинок на активное питание. Видимо, у личинок после инкубации икры в радиоактивных растворах имелись определенные нарушения в организме, которые проявились в форме последствий в критический период жизни (переход на активное питание), когда организм испытывал наибольшую нагрузку.

#### ВЛИЯНИЕ РАДИОАКТИВНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ НА АКТИВНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

На Чернореченском форелевом хозяйстве были поставлены опыты для изучения влияния растворенных в воде радиоизотопов на время активного движения сперматозоидов. Методика работ была очень проста. От одного самца сперму отцеживали в сухой чистый бюкс. Стеклой сухой палочкой небольшое количество спермы наносили на предметное стекло и приливали по капле раствора  $C^{14}$  активностью 5·10<sup>-9</sup>, 5·10<sup>-7</sup> и 5·10<sup>-5</sup> кюри/л; в контрольный вариант добавляли каплю воды из Черной речки.

Таблица 9

Время (в сек) активного движения сперматозоидов

№ пп.	Контроль	Концентрация $C^{14}$ в кюри/л		
		5·10 <sup>-9</sup>	5·10 <sup>-7</sup>	5·10 <sup>-5</sup>
1	42	45	42	43
2	51	42	44	36
3	54	38	35	41
4	43	38	39	41
5	57	45	35	35
6	40	42	37	31
$\bar{x} \pm Sx$	47,83 ± 2,89	41,66 ± 1,86	38,67 ± 1,45	37,83 ± 1,84
$t$	—	1,95	2,81	2,92
$P$	—	>0,05	<0,02	<0,02

При соприкосновении с влажной средой сперматозоиды начинали активно двигаться. Препараты помещали под микроскоп и засекали время, когда поступательные движения прекращались, а оставались лишь колебательные (табл. 9).

Из приведенных данных (табл. 9) видна зависимость активности сперматозоидов форели от уровня радиоактивного загрязнения воды: чем выше концентрация раствора, тем меньше время активного движения сперматозоидов. Отсюда можно предположить, что в воде, содержащей радиоизотопы, оплодотворение икры проходит в худших условиях, чем в чистой воде.

## ВЫВОДЫ

1. Инкорпорированный в икре рыб стронций-90 оказывает влияние на содержание рибонуклеиновой кислоты. Количество РНК статистически достоверно повышается в икре, инкубация которой проводилась в концентрации, близкой к предельно допустимой.

2. Под влиянием радиации изменяется уровень обмена. Интенсивность потребления кислорода икрой бычка-кругляка в опытных растворах отлична от контроля: высокая концентрация приводит к угнетению; самая низкая, близкая к предельно допустимой, концентрация статистически достоверно повышает уровень обмена.

3. Количество гемоглобина у опытных эмбрионов на стадии эритроцитарного кровообращения выше, чем у контрольных. Наиболее высоко оно у эмбрионов из раствора с концентрацией, близкой к предельно допустимой. После выклева на смену псевдостимуляции процесса кровотока приходит угнетение, и количество гемоглобина у опытных эмбрионов становится ниже, чем у контрольных.

4. Четко выраженного влияния радиации на морфологическую картину развития установить не удалось, однако в опытных растворах чаще попадаются уродливые особи и характер уродств у них более глубокий, чем у контрольных.

5. Отход икры в процессе инкубации в опытных растворах был одинаков с контролем, но влияние на выживаемость имеет место. При выращивании личинок форели до 30-дневного возраста больший отход был в опытных партиях, причем в концентрации  $2-2,5 \cdot 10^{-7}$  кюри/л стронция-90 — иттрия-90 отход личинок составил 100%.

6. В радиоактивных растворах ухудшаются условия оплодотворения икры. Время активного движения сперматозоидов снижается с увеличением концентрации радиоизотопа.

7. В целом полученные данные свидетельствуют о вредном влиянии на физиологическое состояние эмбрионов растворенных в воде радиоизотопов в концентрациях, близких к ПДК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Айтхожин М. А., Белицина Н. В., Спирин А. С. Нуклеиновые кислоты на ранних стадиях развития эмбрионов рыб. «Биохимия». Т. 29, № 1, 1964.
2. Белицина Н. В., Гаврилова Л. П., Айтхожин М. А., Нейфах А. А., Спирин А. С. Информационная рибонуклеиновая кислота на ранних стадиях развития зародыша вьюна (*Misgurnus fossilis* L.). ДАН СССР. Т. 153, № 2, 1963.
3. Белицина Н. В., Гаврилова Л. П., Нейфах А. А., Спирин А. С. Действие радиационной инактивации ядер на синтез информационной рибонуклеиновой кислоты у зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis* L.). ДАН СССР, Т. 153, № 5, 1963.
4. Браше Ж. Биохимическая эмбриология. М., ИЛ, 1961.
5. Винберг Г. Г. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. Минск. Изд-во БГУ, 1956.

6. Закутинский Д. И., Парфенов Ю. Д., Селиванова Л. Н. Справочник по токсикологии радиоактивных изотопов. Медиздат, 1962.
7. Кафиани К. А., Татарская Р. И., Конопкайте С. М. Фосфорный обмен в эмбриональном развитии рыб. «Биохимия». Т. 23. № 3, 1958.
8. Коржуев П. А., Радзинская Л. И. О микрометоде определения гемоглобина. «Вопросы ихтиологии». Вып. 9, 1957.
9. Курляндская Э. Б. Некоторые вопросы токсикологии радиоактивных веществ. Материалы по токсикологии радиоактивных веществ. Вып. II. Медгиз, 1957.
10. Лесли И. Содержание нуклеиновых кислот в тканях и клетках. Сб. «Нуклеиновые кислоты». М., ИЛ, 1957.
11. Плохинский Н. А. Биометрия. Изд. Сибирского отделения АН СССР. Новосибирск, 1961.
12. Урбах В. Ю. Биометрические методы. М. Изд-во «Наука», 1964.
13. Хочкис Р. Биологическая роль дезоксирибонуклеиновых кислот. Сб. «Нуклеиновые кислоты». М., ИЛ, 1957.
14. Schmidt G. A. and Thannhauser S. A. A method for the determination of desoxyribonucleic acid in animal tissues. J. Biol. Chem. 161, № 1, 1945.
15. Elson D., Gustafson T., Chargaff E., The nucleic acids of the sea urchin during embryonic development. J. Biol. Chem., 209, 285, 1954.