

**Федеральное государственное унитарное предприятие
«Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства»**

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ ИХТИОФАУНЫ
АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОГО БАССЕЙНА**

Методическое руководство

**Ростов-на-Дону
2005**

УДК 597-19: (597-11+597-1.05+575)(262.54+262.5)

ББК 28.693.32Я7

Ф504

Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна/ Методическое руководство. - Ростов-на-Дону: Эверест, 2005. – 000 с.

Рецензент: **А.А. Кожин**, доктор медицинских наук, профессор Ростовского государственного университета, лауреат Государственной премии РФ.

ISBN

В методическом пособии описываются методы физиологического, биохимического, морфологического и генетического анализа, приводятся изменения, которые происходят у гидробионтов в периоды с разной антропогенной нагрузкой среды обитания, а также некоторые показатели общего обмена веществ и детоксикационных систем основных промысловых рыб Азово-Черноморского бассейна – осетра, севрюги, судака, тиленгаса, тарани, сельди – в разные периоды их жизненного цикла.

Книга рассчитана на ихтиологов, физиологов, рыбоводов, биологов, студентов и аспирантов биологических и рыболовных вузов.

Авторский коллектив:

д.б.н. Г.Г. Корниенко (руководитель), **к.б.н. Н.Е. Бойко**, **к.б.н. Л.А. Бугаев**,
к.б.н. В.А. Дехта, **к.б.н. С.И. Дудкин**, **В.Ф. Кузина**, **Т.В. Ложичевская**, **О.А. Рудницкая**, **к.б.н. С.Г. Сергеева**.

Редактор: **Ю.Е. Тютина**

Художественный редактор: **Е.С. Потапенко**

УДК 597-19: (597-11+597-1.05+575)(262.54+262.5)

ББК 28.693.32Я7

© ФГУП «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства» (АзНИИРХ), 2005.

ISBN

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

1. Методы оценки функционального состояния основных промысловых рыб

*Г.Г. Корниенко, С.Г. Сергеева, Т.В. Ложичевская,
Л.А. Бугаев, О.А. Рудницкая*

1.1. Биохимические методики исследования

Определение белка по методу Лоури

Определение холестерина по методу Мрскоса и Товарека
(в модификации Илька)

Методика определения белка в сыворотке крови

Определение гемоглобина по Сали

Количественное определение жира по методу Рушковского
в модификации Сокслета.

Метод определения липидов в сыворотке крови. Окраска
по Свану

Метод полиэтилгликолевой преципитации связанного
конъютина для определения иммунных комплексов.

1.2. Методы проведения гистологических исследований органов и
тканей рыб (гонады, кровь, печень, селезенка и др).

1.3. Методы оценки гематологических характеристик

2. Методы оценки воздействия антропогенного загрязнения водной среды на функциональные качества промысловых рыб

С.И. Дудкин

2.1. Определение содержания цитохромов В5 и Р450

2.2. Определение содержания жирорастворимых витаминов

2.3. Определение активности супероксиддисмутазы

(СОД)

2.4. Определение активности катепсина Д

2.5. Определение активности ДНК-азы и РНК-азы

3. Физиология раннего онтогенеза осетровых рыб

Н.Е. Бойко

3.1. Методы изучения поведенческих реакций молоди осетра на «запечатленный» химический стимул

4. Методы учета хромосомных aberrаций

В.Ф. Кузина

4.1. Анафазный метод учета хромосомных aberrаций в клетках зародышей рыб

5. Методы популяционной генетики и комплексного морфометрического анализа

В.А. Дехта, С.Г. Сергеева.

5.1. Метод биохимического полиморфизма

Электрофорез белков

Параметры аллозимной изменчивости и биометрические методы

5.2. Комплексный морфометрический анализ

Морфометрия

Дискриминантный анализ морфометрических индексов

Структура средних и корреляций индексов в группах

6. Основные результаты физиолого-биохимических и генетических исследований гидробионтов Азово-Черноморского бассейна

Г.Г. Корниенко

Заключение

Литература

ВВЕДЕНИЕ

В АзНИИРХе более 30 лет проводятся исследования ценных промысловых объектов Азово-Черноморского бассейна, связанные с физиолого-биохимическими и генетическими аспектами их биологии, применительно к задачам рационального планирования промысла и промышленного воспроизводства. В процессе работ исследуется функциональное состояние объектов, определяется генотоксичность среды обитания и последствия изменений физиологических параметров, изучается популяционно-генетическая структурированность популяций ценных промысловых рыб. При этом особое внимание уделяется, с одной стороны, репродуктивным возможностям, нарушениям поведения и другим функциональным отклонениям, что необходимо для понимания влияния особенностей экологии среды, связанной с загрязнением региона, с другой – изучению состояния структуры популяций промысловых рыб с целью оптимизации промысловых нагрузок на их структурные компоненты и сохранения внутривидового разнообразия как основы адаптационного потенциала видов, обитающих в бассейне.

Полученные результаты учитываются при разработке кратко- и долгосрочных прогнозов состояния промысловых запасов, определении допустимого вылова.

Важной составляющей процесса прогнозирования является учет результатов ежегодного мониторинга репродукционного потенциала таких рыб, как осетровые, пиленгас, судак, что позволяет вносить коррективы в объемы возможного вылова рыб, исключая из состава нерестовых мигрантов особей, утративших репродуктивные качества, гонады которых частично или полностью резорбированы при жировом перерождении гонад. Этих рыб отличают негативные сдвиги физиолого-биохимических и гормональных показателей, обуславливающих нарушение миграции и, как следствие,

характера и времени подходов к районам нереста и промысла. Мониторинг функционального состояния гонад позволяет определить часть рыб, не участвующую в воспроизводстве, и тем самым более точно рассчитывать пополнение популяции.

С учетом указанных обстоятельств и условий промысла в Азово-Черноморском бассейне изучение физиологии, биохимии и генетики популяций промысловых рыб является необходимой частью разработки прогноза общего допустимого улова (ОДУ).

1. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСНОВНЫХ ПРОМЫСЛОВЫХ РЫБ

Методические руководства по физиологии рыб немногочисленны, устарели и изданы узкоспециализированными организациями (Руководство ..., 1962; Инструкция ..., 1986; Сборник инструкций ..., 1986)

1.1. Биохимические методики исследования

Работы по изучению физиологического статуса ведутся на следующих рыбах Азовского бассейна: осетровые (осетр, севрюга), судак, лещ, тарань, пиленгас, камбала-калкан, сельдь и другие виды.

Сбор полевого материала организуется таким образом, чтобы была представлена неоднородность популяций исследуемых промысловых объектов. Для этого в разные периоды жизненного цикла исследуемого вида для проведения анализов отбираются пробы. Во время нерестовых миграций, нагула и зимовки, а также в учетных рейсах по стандартной сетке станций из уловов береговых ставников в морских районах и закидных неводов в реке в период промысла исследуются не менее 30 самок и 30 самцов каждого конкретного вида. Каждый взятый для анализа экземпляр измеряется, определяется его пол, оценивается общая экстерьерная характеристика. Все данные заносятся в журнал, где также указывается время, место отлова, орудия лова и т.д.

Чтобы собранный материал правильно отражал изменения, происходящие в организме рыб, учитывают и регистрируют в журнале:

- район взятия проб;
- время (сезон);
- длину рыбы, массу и возраст;
- характер питания;
- пол;

- стадию зрелости гонад.

В зависимости от поставленной задачи в уловах исследовательских, контрольных или промысловых орудий изучаются разные размерные группы данного вида или для анализа подбираются экземпляры, которые по длине приближаются к средним размерным группам с учетом пола и особенностей степени зрелости их гонад.

В качестве индикаторов физиологического состояния рыб используются следующие показатели:

- концентрация гемоглобина и сывороточного белка;
- содержание белка в мышцах и икре;
- содержание влаги в мышцах и икре;
- содержание общих липидов, холестерина в сыворотке, мышцах и икре;
- циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК)

Кровь для анализа при отсечении хвостового стебля берут в пробирку из хвостовой вены у живой рыбы (судак, тарань) и из жаберной артерии (осетровые рыбы) и отстаивают при комнатной температуре. Через 10–12 часов после ретракции фибринового сгустка сыворотку отсасывают микропипеткой. Пробы мышц навеской до 50 г берут из первой трети тела по всей ширине поперечного среза, гонады – из средней части половой железы (навеска 20-30 г). Пробы замораживают и хранят в холодильнике при температуре минус 25 °С.

Концентрацию белка в сыворотке крови определяют на рефрактометре ИРФ-22, концентрацию гемоглобина – по методу Сали, содержание белка в тканях – по методу Лоури (Пушкина, 1963); количество общих липидов – по методу Рушковского (Кривобок, Тарковская, 1962), влагу – высушиванием до постоянного веса при температуре 80 °С, циркулирующие иммунные комплексы – по методу Гашковой.

Для гистологического анализа образцы тканей (гонады, печень, селезенка, эндокринные железы, пищеварительный тракт) фиксируются в 10%-ном растворе формалина или смеси Буэна.

Степень зрелости половых продуктов оценивают на основании макроскопических признаков и гистологического анализа. Согласно шкале зрелости гонад (Проблемы..., 1988; Сакун, Буцкая, 1963) фиксируют наличие патологических процессов в половых железах. Для этого определяют диаметр ооцитов, строение их оболочек, структуру цитоплазмы (степень вакуолизации, диаметр желтковых гранул, жировые включения), положение ядра в ооците, количество и расположение ядрышек, состояние фолликулярного эпителия и других тканей яичников (Трусов, 1964). Состояние семенников оценивают по присутствию в цистах семенников половых клеток разных фаз: сперматогонии, сперматиды, спермии (Турдаков, 1972).

Определение белка по методу Лоури

Метод основан на образовании биуретового комплекса, который в присутствии фенола дает характерную окраску пропорционально количеству белка.

Чувствительность метода – 0,2 М в 0,05 мл исследуемого раствора.

Оборудование: Спектрофотометр СФ-4 или фотоэлектроколориметр.

Посуда: пипетки на 0,1; 1,0; 2,0 мл; мерные цилиндры или колбы на 100, 500 и 1000 мл; пробирки стеклянные.

Реактивы:

- 0,1 N раствор NaOH;
- реактив А - 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 N растворе NaOH;
- реактив В - 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе виннокислого натрия или калия;

- реактив С – перед анализом 49 мл реактива А смешивают с реактивом В;

- реактив Фолина;

- реактив Е готовят из реактива Фолина, разводя его дистиллированной водой так, чтобы кислотность приготовленного раствора была равна единице. Например, если кислотность реактива Фолина равна 2,3, для приготовления реактива Е следует взять 10 мл реактива Фолина и 13 мл дистиллированной воды.

Калибровочный график

На торсионных весах взвешивают 10 мг белка (яичный альбумин) и переносят его в мерную колбу на 100 мл. Небольшими порциями добавляют 0,1 N раствор NaOH и осторожно растворяют белок с помощью стеклянной палочки (при взбалтывании образуется пена). Для полного растворения можно оставить раствор в колбе на 8-10 часов и затем довести щелочью до 100 мл.

В серию пробирок берется 0,1; 0,2; ... до 1 мл (10 г, 20 г, 30 г... 100 г) исходного раствора, объем в каждой пробирке доводят до 1 мл дистиллированной водой: соответственно приливают 0,9; 0,8 и т.д. мл воды. Контроль – 1 мл воды. После колориметрирования по полученным цифрам строят калибровочную кривую. На оси абсцисс откладывают значения концентрации (10 г, 20 г, 30 г и т.д.), по оси ординат – значения экстинции.

Ход анализа. На торсионных весах взвешивают 200 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 3 мл дистиллированной воды в фарфоровой ступке. Отмеривают микропипеткой 0,03 мл гомогената и выливают в пробирку с 7,5 мл 0,1 N раствора NaOH, затем взбалтывают.

Из полученного раствора приливают в пробирку 1 мл, добавляют 4 мл реактива С, через 10 минут приливают 0,2 мл реактива Е, после чего через 30

минут смотрят на фотоэлектроколориметре (ФЭК-3) на красном светофильтре ($\lambda = 670$ нм) в кювете толщиной 20 мм. Инкубируют в темноте.

Контроль: 1 мл дистиллированной воды, 4 мл реактива С, 0,2 мл реактива Е.

Расчет. Концентрацию белка определяют по полученным значениям оптической плотности с помощью калибровочной кривой в γ , которую строят на основании ряда точно приготовленных белковых растворов нисходящей концентрации.

При навеске 200 мг количество белка в γ умножается на $K = 2,52$, выражается в мг/г сырой ткани.

Определение холестерина по методу Мрскоса и Товарека (в модификации Илька) (1968)

Принцип реакции: холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает зеленое окрашивание.

Оборудование:

- ФЭК-3;
- пробирки 7-10 мл;
- штатив для пробирок;
- колба 500 мл;
- пипетки 0,1 и 5 мл.

Реактивы:

Раствор 1 – смесь одной части ледяной уксусной кислоты, пяти частей уксусного ангидрида и одной части концентрированной серной кислоты, которая должна выдерживать пробу Саваяля.

Составляющие ингредиенты смешиваются в вышеуказанной последовательности при постоянном охлаждении колбы, в которой готовится смесь. Полученная смесь должна быть бесцветной или слегка желтоватой.

При несоблюдении последовательности добавления реактивов и без охлаждения смесь получается темно-желтой и непригодной к употреблению. Смесь переливается в склянку темного стекла с притертой пробкой и хранится в холодильнике при температуре 4°C до двух недель.

Раствор 2. Стандартный раствор холестерина. 10 мг холестерина растворяют в 10 мл хлороформа (1 мл раствора содержит 1 мг или 1000 μ холестерина).

Ход определения. В химически чистые пробирки наливают пипеткой 2,1 мл смеси (раствор 1), медленно добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки крови, так, чтобы она стекала по стенке пробирки. Пробирку быстро и энергично встряхивают 10-12 раз и помещают в термостат при 37°C на 20 минут. Затем колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре в кювете 0,5 см. После колориметрирования делают расчет по предварительно построенному калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из стандартного раствора холестерина готовят ряд разведений. В пробирки приливают 0,05, 0,1, 0,15, 0,25 мл стандартного раствора и добавляют, соответственно, 2,15, 2,10, 2,05, 2,0, 1,95 мл реактива 1, энергично встряхивают и помещают в термостат при 37°C на 20 минут, после чего колориметрируют.

Калибровочный график строят по цифрам экстинций, полученных в результате колориметрирования стандартных растворов. Для того, чтобы перейти от концентрации холестерина в соответствующей стандартной пробирке к количеству мг% холестерина в опыте, следует цифры соответствующей концентрации умножить на 1000.

Методика определения белка в сыворотке крови

Оборудование: рефрактометр типа РФ-22.

Ход анализа. Пастеровской пипеткой наносят каплю сыворотки крови на призму рефрактометра. Эту операцию нужно производить быстро, не допуская появления пузырьков воздуха в капле. Поворачивая винт прибора, добиваются, чтобы линия границы освещенной и темной частей поля зрения проходила через точку пересечения крестообразно расположенных в окуляре прямых. После этого снимают показания шкалы рефрактометра (коэффициент преломления сыворотки). Согласно данным стандартной таблицы 1, по коэффициенту преломления рассчитывают процентное содержание белка в сыворотке.

Таблица 1. Зависимость между показателем преломления и концентрацией белка в сыворотке крови

Показатель преломления с точностью до тысячной	Концентрация белка при показателе преломления с точностью до десяти тысячной									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,337	0,60	0,66	0,72	0,77	0,83	0,89	0,95	1,01	1,07	1,12
1,338	1,18	1,24	1,30	1,36	1,41	1,47	1,53	1,59	1,65	1,70
1,339	1,76	1,82	1,88	1,94	2,00	2,05	2,11	2,17	2,23	2,29
1,340	2,34	2,40	2,46	2,52	2,58	2,63	2,69	2,55	2,81	2,87
1,341	2,93	2,98	3,04	3,10	3,16	3,22	3,27	3,33	3,39	3,46
1,342	3,51	3,57	3,62	3,68	3,74	3,80	3,86	3,91	3,97	4,03
1,343	4,09	4,15	4,20	4,26	4,32	4,38	4,44	4,50	4,55	4,61
1,344	4,67	4,73	4,79	4,84	4,90	4,96	5,02	5,08	5,13	5,19
1,345	5,25	5,31	5,37	5,43	5,48	5,64	5,60	5,66	5,72	5,77
1,346	5,83	5,89	5,95	6,01	6,07	6,12	6,18	6,24	6,30	6,36
1,347	6,41	6,47	6,53	6,59	6,65	6,70	6,76	6,82	6,38	6,94
1,348	7,00	7,05	7,11	7,17	7,23	7,29	7,34	7,40	7,46	7,62
1,349	7,58	7,63	7,69	7,75	7,81	7,87	7,93	7,98	8,04	8,10
1,350	8,16	8,22	8,27	8,33	8,39	8,46	8,51	8,57	8,62	8,68

1,351	8,74	8,80	8,86	8,91	8,97	9,03	9,09	9,15	9,20	9,26
1,352	9,32	9,38	9,44	9,50	9,55	9,61	9,67	9,73	9,79	9,84
1,353	9,90	9,96	10,02	10,08	10,13	10,19	10,25	10,31	10,37	10,43
1,354	10,40	10,54	10,60	10,66	10,72	10,77	10,83	10,89	10,95	11,01

Определение гемоглобина по Сали

Оборудование и реактивы:

- гемометр Сали (ГС-3);
- капилляр с отметкой 0,02 мл,;
- 0,1 N раствор соляной кислоты (8,2 мл HCl удельного веса 1,19 на 1 л дистиллированной воды);
- дистиллированная вода.

Ход определения. Градуированную пробирку гемометра наполняют до нижней отметки (2 г%) 0,1 N раствором соляной кислоты. Кровь набирают в капилляр до метки (0,02 мл), не допуская попадания пузырьков воздуха, удаляют ее излишек, прикладывая фильтровальную бумагу к кончику капилляра, и выдувают на дно пробирки так, чтобы верхний слой соляной кислоты оставался неокрашенным. Не вынимая пипетки, ополаскивают ее соляной кислотой из верхнего слоя. После этого содержимое пробирки перемешивают, ударяя пальцем по ее дну. Через 5 минут пробирку ставят в гемометр и к испытуемой жидкости небольшими порциями прибавляют дистиллированную воду, каждый раз тщательно перемешивая жидкость с помощью стеклянной палочки. Разведение заканчивают, когда цвет испытуемой жидкости сравнивается с цветом стандартов. По уровню нижнего мениска жидкости определяют количество гемоглобина в г%.

Количественное определение жира по методу Рушковского в модификации Сокслет

Этот метод определения жира по обезжиренному остатку удобен тем, что позволяет одновременно анализировать несколько проб.

Оборудование:

- весы;
- разновесы;
- алюминиевые бюксы;
- термостат;
- аппарат Сокслета;
- электрическая печь;
- фарфоровая ступка с пестиком.

Реактивы: серный эфир.

Предназначенную для анализа пробу помещают в алюминиевый бюкс, высушивают до постоянной массы в термостате при 70° С. Разность между массой сырого и сухого материала показывает содержание в пробе влаги, которую выражают в % от сухой массы.

Высушенную пробу растирают в фарфоровой ступке. Из плотной фильтровальной бумаги делают пакеты (лист размером 6х7 см) по типу аптечных. На пакетах пишут карандашом номер бюкса с пробой и помещают в бюксы.

Бюксы с пакетами высушивают в термостате при 105 °С до постоянной массы. Затем в пакет вносят 100-150 мг растертого исследуемого вещества, пакет закрывают и помещают в бюкс. Бюкс с пробой также высушивают в термостате и доводят до постоянной массы в термостате при 105 °С. Разность между первой и второй массой дает величину взятой навески.

Серию пакетов с пробами помещают в экстрактор Сокслета, где производится экстракция серным эфиром в течение 10-15 часов.

Продолжительность экстракции зависит от количества проб и содержания жира.

Аппарат Сокслета, в котором происходит экстракция жира, состоит из экстрактора, который при помощи шлифов соединен внизу с колбой, а вверху – с обратным холодильником, подключенным к водопроводу. Колбу на три четверти заполняют эфиром и нагревают на слабой электрической печи, не доводя эфир до кипения, которое происходит при 40 °С. Подогревать следует очень осторожно, так как эфир легко воспламеняется. При нагревании колбы пары эфира поднимаются по боковой трубке и конденсируются в холодильнике. Охлажденный эфир скапливается в экстракторе и растворяет жир пробы. После того как высота эфирного столба в экстракторе достигает верхнего края сифона, он переливается обратно в колбу. Эфир в колбе снова испаряется, и весь процесс повторяется до тех пор, пока весь жир не переместится в колбу. По окончании экстракции пакеты раскладывают в те же пронумерованные бюксы и высушивают в термостате до постоянной массы. Разница между массой навески до экстракции и массой обезжиренного остатка составляет количество жира во взятой навеске. Его выражают в процентах сухого вещества. Если известен процент содержания влаги в пробе, то содержание жира можно выразить в процентах от сырого вещества.

Метод определения липидов в сыворотке крови. Окраска по Свану

Оборудование:

- ФЭК;
- пробирки стеклянные;
- мерные цилиндры 50 –100 мл;
- хроматографическая бумага;
- пипетки 0,1 и 5 мл.

Реактивы:

- спиртовой раствор судана черного;
- спирт этиловый 50%, 60%, 100% (безводный);
- 20 %-ный раствор уксусной кислоты в безводном спирте;
- хлороформ.

Ход определения. На хроматографические полоски шириной 2-3 см наносят 0,02 мл сыворотки (по две параллельные пробы) и на каждую полоску – по 0,02 мл стандартного раствора липидов.

Приготовление стандартного раствора. 100 мг жира из проб, взятых для анализа на жир, взвешивается на торсионных весах на фильтровальной бумаге, затем эта бумага помещается в мерную колбу и заливается 10 мл хлороформа.

Окрашивание. 100 мг красителя судана черного разводят в 100 мл 60%-ного этанола и подогревают до кипения при постоянном помешивании на водяной бане. После охлаждения раствор фильтруют. Для приготовления 60%-ного этанола к 100 мл спирта прибавляют 63 мл воды.

Полоски хроматографической бумаги красят в цилиндре в темноте в течение 12 часов.

Полоски отмывают 3 раза в течение 30 минут в 50%-ном этаноле (к 100 мл спирта добавляют 95,89 мл воды).

Для элюирования окрашенные пятна вырезают из полоски, нарезают на мелкие кусочки и помещают в пробирки. Из бюретки в каждую пробирку приливают по 4 мл элюирующей жидкости. Пробирки закрывают пробками, энергично взбалтывают и оставляют на 17 час в темноте.

Жидкость для элюирования: 20%-ный раствор уксусной кислоты в безводном этаноле.

Колориметрирование ведется на ФЭК – М при зеленом светофильтре (длина волны 490 нм) в кюветах толщиной 0,5 см против контроля (20% -

наяуксусная кислота в этаноле после отмывки неокрашенных участков хроматографической бумаги).

Расчет

Экстинция стандартной пробы - 1000

Экстинция пробы – X.

$X = \text{экстинция пробы} \times 1000 / \text{экстинция стандарта (мг)}$.

1.2. Метод полиэтиленгликолевой преципитации связанного конъютина для определения иммунных комплексов

Оборудование: спектрофотометр СФ –46.

Реактивы:

- боратный буфер рН 8,4;

- полиэтиленгликоль 6000 МВ (ПЭГ).

В опыт берется полиэтиленгликоль 4,166% и разведенная сыворотка крови. Контроль – боратный буфер рН 8,4 и разведенная сыворотка крови.

Опыт и контроль инкубируют при комнатной температуре 60 минут. Затем измеряют помутнение в пробирке с ПЭГом и сравнивают с сывороткой без ПЭГа (то есть против контроля) на СФ при длине волны 450 нм. Результат дает экстинция, умноженная на 1000 (в условных единицах).

Для рациональной организации промысла и уточнения ОДУ ежегодно проводят оценку функционального состояния промысловых рыб по комплексу физиологических и биохимических показателей, методики которых приведены выше.

Так, в 1991-1999 гг. в условиях интенсивного антропогенного воздействия была выявлена максимальная частота встречаемости в море (15-30%) особей нерестового стада осетра с нарушениями метаболических процессов. У некоторых особей отмечалось или снижение белка и

холестерина, или повышение белка и липидов в сыворотке крови. У таких рыб установлено нарушение структуры и биохимического состава зрелых ооцитов в сторону уменьшения содержания белка и повышения количества влаги и холестерина. У некоторых рыб выявлено ожирение печени. Такие изменения приводят к тотальной дегенерации гонад и нарушению миграционного поведения, что ведет к снижению промысловых уловов, базирующихся на подходах зрелых рыб в береговую промысловую зону.

Анализ физиологических параметров пиленгаса из популяции, сформированной в Азовском бассейне, выявил изменения в обмене веществ по сравнению с рыбами из нативного ареала (Дальний Восток). У азовского пиленгаса отмечено повышенное накопление белка и липидов в сыворотке крови, а также жира в мышцах и печени, что приводит к ускорению роста и созревания рыб. В дальнейшем это может отразиться на поведении пиленгаса в период зимовки, нагула и нереста, что необходимо учитывать при прогнозе допустимых уловов.

Сравнение физиологического состояния нерестовой части популяции судака в настоящее время с периодом осолонения моря в 70-е годы и последующими 80-ми годами показало, что рост показателей осеннего нагула. Количество белка в сыворотке на 20-25 %, жира в печени – на 40, жира в мышцах – в 1,5-2 раза выше, чем у самок судака в предыдущие годы. Выявлены различия в содержании белка, липидов, холестерина в сыворотке крови в осенний и преднерестовый периоды у самок в море и в прибрежных районах. Наличие в популяции в последние годы до 20% самок с низким содержанием запасных веществ, в том числе и липидов в печени (ниже 6 % на сухой вес ткани), предполагает, что эта группа рыб остается в море и резорбирует половые продукты. Подтверждением этому может быть наличие в осенний период самок с тотальной резорбцией гонад, отмечаемое нами в 1998-2000 гг.

1.3. Методы проведения гистологических исследований органов и тканей рыб (гонады, кровь, печень, селезенка и др.)

(Роскин, 1951; Пирс, 1962)

Антропогенные изменения водных систем не могли не отразиться на созревании и воспроизводстве гидробионтов, особенно рыб. Поэтому процесс созревания осетровых в современных условиях исследовался на разных поколениях осетра. Наблюдениями были охвачены морской и речной периоды их жизни.

Изменяющаяся экологическая ситуация в Азовском бассейне и широкий спектр морфологических, биохимических и функциональных нарушений, выявленных в организме осетровых рыб, а также снижение численности и изменения характера нерестовых миграций вызывают необходимость ежегодного проведения мониторинга физиологического состояния нерестового стада осетровых и других рыб Азово-Черноморского бассейна.

Наряду с биохимическими параметрами, большой информативностью отличаются цитогистологические показатели. Так, изучение воздействия загрязняющих веществ среды обитания позволяет выявить изменения структуры хромосом, хромосомные aberrации в клетках гидрообъектов (плавниковая кайма личинок рыб), что может быть причиной нарушений органогенеза и возникновения морфологических уродств.

Оборудование:

- термостаты на 37° С и 56° С;
- печь для расплавления препаратов;
- холодильники;
- микротомы;
- микроскопы;

- электроплитки;
- термостолы;
- 11-клавишные счетчики, посуда.

Фиксация. Материал, взятый для микроскопического исследования, помещают в фиксирующую жидкость. Цель фиксации – задержать изменения, возникающие в тканях, изолированных от живого организма, и сохранить тканевые и клеточные структуры в состоянии их прижизненного строения.

Чтобы кусочки ткани размером 0,5-1,0 см равномерно омывались и пропитывались фиксатором, емкости встряхивают через каждые 1-2 часа.

В качестве фиксатора используют 10%-ный раствор формалина, приготовленный на физиологическом растворе, так как дистиллированная вода вызывает значительное обводнение и набухание тканей. Для гистологических и гистохимических исследований в качестве фиксатора применяют жидкость Буэна, в которой ткань может сохраняться от 48 часов до 30 дней.

Промывка и обезвоживание материала. Материал очищают от самого фиксатора и различных осадков, возникающих во время фиксации, в проточной водопроводной воде в течение 10-20 минут.

Для обезвоживания используют набор спиртов (этиловый спирт) повышающейся концентрации от 70 до 100 °.

Для получения хороших микроскопических препаратов большое значение имеет постепенность обезвоживания, так как при быстром обезвоживании ткани (особенно рыхлой консистенции) могут сморщиваться и деформироваться (Елисеев, 1954; 1959).

Используют следующую методику обезвоживания спиртами: 70° – 2 ч, 80° – 12 ч, 90° – 2 ч, 96° – 1 ч, 100° – 1 ч.

Периодически наборы спиртов обновляют, так как в процессе работы происходит их обводнение и загрязнение веществами, извлекаемыми из материала, особенно жиром.

Заливка материала в застывающие среды. После обезвоживания фрагменты органов тщательно промокают фильтровальной бумагой и помещают в 1%-ный раствор целлоидина.

Для приготовления раствора 1 г целлоидина растворяют в 100 мл смеси равных частей спирта и эфира. В этой концентрации целлоидин легко проникает вглубь объекта и полностью пропитывает его. Длительность содержания материала в растворе целлоидина составляет в среднем шесть суток.

На следующем этапе производят очистку материала от целлоидина. Для этого образцы органов и тканей отмывают два часа в хлороформе, затем два часа – в термостате при температуре 37 °С в снегоподобной массе, представляющей собой насыщенный раствор парафина в хлороформе. Далее материал в термостате при температуре 56 °С пропитывают в чистом парафине в течение часа, затем пробы переносят в чистый парафин еще на час, после чего кусочки тканей заливают смесью из 100 г парафина с 5 г воска и быстро охлаждают в воде с кубиками льда для предотвращения образования воздушных пузырьков в парафиновых блоках.

Полученные парафиновые блоки наплавливают на деревянные кубики, необходимые для закрепления блоков при резке тканей на микротоме.

Для заливки материала используют белый парафин, имеющий точку плавления не выше 52-54 °С. Бóльшую пластичность парафину придает добавление 5% пчелиного воска. С целью вытеснения из расплавленного парафина излишков газов его несколько раз кипятят на электрической плитке с закрытой спиралью и затем быстро охлаждают на ледяной бане.

Подготовка срезов. Для более прочного приклеивания парафиновых срезов обезжиренные предметные стекла предварительно тщательно смазывают смесью белка с глицерином в соотношении 1:1. Нанесенный на предметное стекло тонкий слой смеси нагревают над пламенем спиртовки для удаления влаги. В дальнейшем эти стекла используют для наклеивания срезов препарата. Стекла подписывают тушью, смешанной с белком (1:1) и прокаливают.

Срезы готовят на санном микротоме с использованием микротомных ножей. Толщина получаемых срезов — 1, 2, 3, 4, 5, 6 мкм.

Чтобы удалить складки и расправить ленты или серии срезов, их помещают на поверхность в широком сосуде (кристаллизатор) с водой при температуре 40 °С. Срезы расправляют препаровальной иглой, помещают на специально приготовленное предметное стекло и высушивают на специальном столике с подогревом до 37 °С. Стекла обезжиривают в смеси спирт:эфир (1:1).

Окраска срезов. Перед окраской срезы, хорошо высушенные и приклеенные к предметным стеклам, освобождают от парафина. Для этого срезы помещают на 30 с в ксилол I, затем на 30 с – в ксилол II. После растворения парафина препараты выдерживают в течение минуты в 100° спирте, затем еще одну минуту – в 70 °спирте. После спиртов препараты промывают дистиллированной водой.

Окрашивание срезов производят по методу Маллори (Роскин,1951).

Срезы из дистиллированной воды переносят в 0,1%-ный раствор кислого фуксина на три минуты. При этом срезы приобретают розовую окраску. Следующий этап – пять минут в 1%-ном растворе фосфорномолибденовой кислоты, который закрепляет окраску кислым фуксином. Срезы ополаскивают в дистиллированной воде и на одну минуту

погружают в смесь Маллори из анилинового синего, оранжевого G и щавелевой кислоты (Роскин, 1951).

После окрашивания срезы дифференцируют 70° спиртом (2-3 с) и 96° спиртом (2-3 мин), проводят через ксилол и заключают в канадский бальзам. Готовые препараты могут храниться бессрочно. Их изучают под микроскопом при увеличении объективов 8х, 40х, 90х (иммерсия).

Микроскопирование. Окрашенные препараты срезов тканей микроскопируют на микроскопах “Olympus” (Япония) и “Jenamed” (Германия).

Выбор увеличения при рассмотрении объектов от 40х до 1000х зависит от конкретных задач.

При микроскопировании обращают внимание на признаки наличия/отсутствия морфологических изменений в клетках и тканях, имеющих прогностическое значение для определения функционального состояния органа. Микроскопированием определяют:

- для гонад — диаметр зрелых и незрелых ооцитов, диаметр ядра ооцитов, расстояние от оболочки ооцита до ядра как показатель стадии зрелости ооцита (Сакун, Буцкая, 1963), деформированность ооцитов, состояние цитоплазмы, стадию зрелости мужских половых продуктов (Турдаков, 1972), состояние стенок ампул и кровеносных сосудов;

- для печени — структуру паренхимы и соединительной ткани, диаметр ядер гепатоцитов, состояние кровеносных сосудов, состояние цитоплазмы гепатоцитов;

- для селезенки — то же самое, что и для печени, а также размеры красно-белой пульпы, наличие клеток крови, скопление пигментов;

- для почек — состояние эпителия извитых канальцев, состояние гемопоэтической, соединительной тканей, Боуменовых капсул, скопление пигментов.

Цитометрические исследования проводят с помощью окуляр-микрометра с ценой деления, определенной для каждого микроскопа индивидуально.

1.4. Методы оценки гематологических характеристик (Глаголева, 1981; Иванова, 1983; Житенева и др.1989; Житенева и др.1997; Козинец и др. 1997; Житенева 1999)

Взятие крови. При проведении гематологических анализов кровь берут у рыбы сразу же после отлова, иначе изменится общая картина показателей.

Кровь берут из хвостовой вены или луковицы аорты, а также из сосудов жабр. Существует определенная последовательность взятия крови на разные виды анализа. В первую очередь берут кровь в пипетку Сали для определения содержания гемоглобина, затем - в смесители для подсчета эритроцитов и лейкоцитов, далее – в препарат Панченкова для определения скорости оседания эритроцитов в капилляр гематокрита, последним делается мазок.

Кровь при работе с ценными (осетровые) или редкими рыбами берут прижизненным способом. В такой ситуации используется пипетка Пастера, которой артериальную кровь с некоторой примесью венозной из гемального канала хвостового стебля набирают однократно, сразу для всех манипуляций.

Для полного клинического анализа используют особей не меньше 1,5-2 г, у рыб с меньшей массой можно сделать только мазок для определения лейкоцитарной формулы и морфологической характеристики эритроцитов. Причем для получения достоверных результатов следует сделать не менее 10 параллельных определений в каждой из исследуемых групп.

Определение форменных элементов крови в окрашенном мазке. Для изучения структуры клеток, подсчета незрелых эритроцитов (с целью оценки интенсивности эритропоэза) и определения лейкоцитарной формулы делается мазок крови.

Техника приготовления мазка. На чисто вымытое и обезжиренное предметное стекло наносят каплю крови, отступив 1,5-2 см от его края, с помощью специального шлифованного стекла, поставив его под углом 45°, затем легким и быстрым движением растягивают каплю по предметному стеклу до полного ее исчерпывания.

Правильно сделанный мазок тонкий, прозрачный, желтоватого цвета. Мазок сушат на воздухе. Высушенному мазку присваивают номер, указывают дату. Данные проставляют на предметном стекле. Запись в соответствии с номером делают в полевом дневнике.

Фиксация мазка. Сухой мазок обрабатывают фиксирующими жидкостями, придающими форменным элементам стойкость к содержащейся в красителях воде. Для фиксации используют метиловый спирт, 96° этиловый спирт или смесь его с равным количеством эфира (мазок погружается в фиксатор на 20-30 минут).

Фиксирующая жидкость служит неограниченное время. После фиксации мазок ставят в вертикальное положение на фильтровальную бумагу в специальный контейнер для просушивания, затем красят.

Окраска мазка. Окрашивание производят по методу Романовского стандартным раствором Гимза, который заключается в избирательном поглощении трех красящих веществ: азура, метиленовой сини и эозина. Азур имеет амфотерноосновную реакцию, эозин – кислую, а метиленовая синь – щелочную (Глаголева, 1981).

Краска Гимза состоит из 3 г азура II (смесь равных частей азура I и метиленового синего), 0,8 г эозина водорастворимого желтого, 250 мл метилового спирта, 250 мл глицерина.

Окраску проводят над чашкой Петри. Мазки располагают на двух параллельных стеклянных палочках, соединенных на концах резиновыми трубками и положенных на края емкости.

Краску наливают пипеткой толстым слоем на мазок и оставляют на 20-30 минут. Затем ее сливают, и препарат промывают в течение 10 минут под струей водопроводной воды, после чего стекла ставят на фильтровальную бумагу вертикально. Для хранения готовые мазки помещают в специальный контейнер (мазок к мазку) поверхностью вовнутрь, чтобы на него не села пыль. Промокать фильтровальной бумагой не рекомендуется – на мазке останутся бумажные волокна, и он может быть поврежден механически.

Отпечатки кроветворных органов. Для исследования кроветворных органов, позволяющих судить об уровне кроветворения, готовятся отпечатки селезенки, печени и головного отдела почек. Методика тканевых отпечатков имеет ряд преимуществ перед гистологическими парафиновыми срезами: во-первых, эти отпечатки отражают без искажения состояние тонкой структуры клеток гемопоэтической ткани; во-вторых, сжатие в методе тканевых отпечатков отсутствует. Последнее позволяет сравнивать клетки сосудистого русла крови и клетки, присутствующие в кроветворных органах на всех стадиях эритропоэза. Для получения отпечатков пинцетом захватывают орган и на расстоянии 5-6 мм от концов пинцета отрезают его. Затем срезанной поверхностью проводят по предметному стеклу. Отпечатки целесообразно накладывать поперек стекла таким образом, чтобы следы от печени, почек и селезенки одной и той же рыбы были на одном препарате. Следует иметь в виду, что перед всеми указанными манипуляциями из органа предварительно выпускают как можно больше крови, что достигается в процессе взятия крови на анализ гематологических показателей из хвостового сосуда. Маркировка, фиксация, окраска, просушка отпечатков проводится так же, как и при работе с мазками крови.

Отпечатки помещают на 10 минут в фиксирующую жидкость Максимова (100 см³ жидкости Ценкера и 5–10 см³ формалина); затем препараты 10-20 минут промывают водопроводной водой и пропускают через

спирты 70-100° (по 10 минут в каждом). Отпечатки вновь помещают на 2-3 минуты в 70°-ный спирт, после чего не менее 10 минут выдерживают в дистиллированной воде. Окрашивают по методу Паппенгейма, без предварительного высушивания (Pappenheim, 1899, цит. по Пирсу, 1961)

Метод сохранения мазков и отпечатков. На предметное стекло с фиксированным и окрашенным мазком (или отпечатками) наносят пипеткой большую каплю пленкообразующей смеси: к 0,5 мл клея БФ-6 прибавляют 3 мл абсолютного спирта, 3 мл бутилового спирта. Покачивая стекло, капли дают равномерно растечься по его поверхности. Избыток с края стекла удаляют фильтровальной бумагой, и стекло с препаратом кладут на горизонтальную поверхность для просушивания. При комнатной температуре пленка высыхает за 15-20 минут. Ускорить сушку можно, поместив препарат в термостат при 60 °С.

Надписи, сделанные на предметном стекле водным раствором туши, полностью сохраняются.

После микроскопирования иммерсионное масло удаляют сухой фланелевой тряпочкой.

Этот способ значительно проще, удобнее гистологического метода, когда готовый препарат заключают в канадский бальзам. Использование кедрового масла для этой цели нежелательно, так как, высыхая, он кристаллизуется и при длительном хранении приводит к порче препарата.

Подсчет элементов красной крови. Эритроциты – преобладающая клеточная форма крови рыб. Зрелые клетки красной крови эллипсоидной формы имеют диаметр 5x15 микрон (4,5x7,0 – 12,0x18,0). В центре расположено несколько вытянутое ядро темно-фиолетового цвета. Цитоплазма этих клеток, благодаря наличию гемоглобина, оксифильная, розовато-желтого цвета. Зрелые эритроциты здоровых рыб всегда одинаковы по величине (рис. 1).

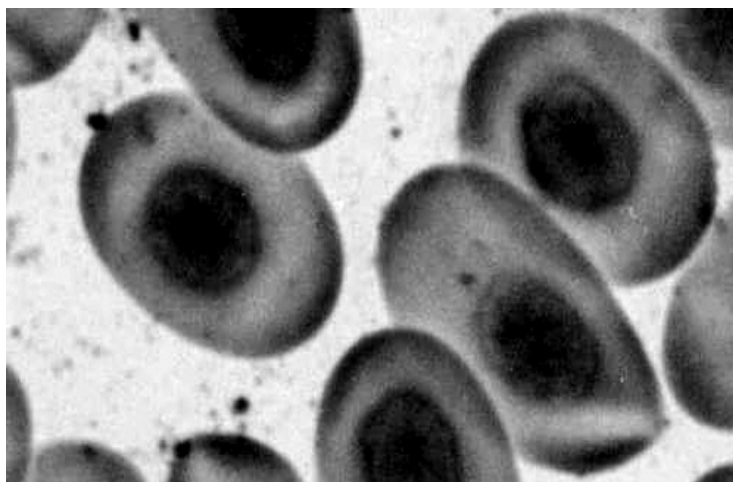


Рис. 1. Эритроциты. Норма

Разнообразие размеров (анизоцитоз) является признаком патологии. В то же время пойкилоцитоз – отклонение от нормы в форме, если он не носит массового характера, – не всегда свидетельствует о патологии: эритроциты в процессе движения вращаются вокруг короткой и длинной своих осей, сталкиваются, деформируясь, несколько изменяя форму (рис.2).

При оценке эритропоза определяют процентный состав незрелых эритроцитов. Цитоплазма их окрашена более базофильно, ядра значительно светлее, рыхлые, крупные. Чем клетка менее зрелая, тем базофильнее ее цитоплазма, тем светлее, крупнее и рыхлее ядро. Совсем молодые эритроциты округлые, ядра у них большие и круглые (рис. 3).

Методику подсчета незрелых эритроцитов сводят к просчету по всему мазку (в различных его участках) 500 эритроцитов, и среди них отмечают количество незрелых форм, которое выражается в процентах, где за 100% принимают общее количество просчитанных на мазке эритроцитов.



Рис. 2. Изменение формы эритроцитов

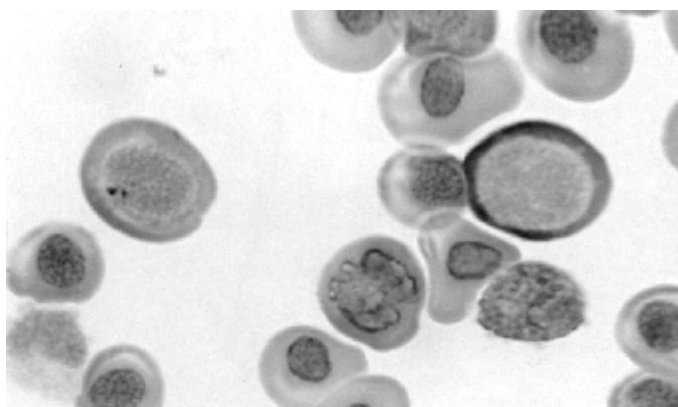


Рис. 3. Молодые клетки крови.

Подсчет элементов белой крови. Лейкоцитарную формулу определяют, подсчитывая в окрашенных мазках крови рыб 200 лейкоцитов, и выражают в виде процентного соотношения отдельных видов лейкоцитов. Ввиду того, что более крупные формы клеток (моноциты, нейтрофилы, миелобласты) располагаются больше по периферии, вдоль наружных краев мазка, а более мелкие (лимфоциты, микромиелобласты) находятся ближе к центру, клетки подсчитывают всегда по одной и той же определенной системе: половину клеток считают на одном конце мазка по

зигзагообразной линии, другую половину — на другом конце, по тому же принципу (рис. 4).

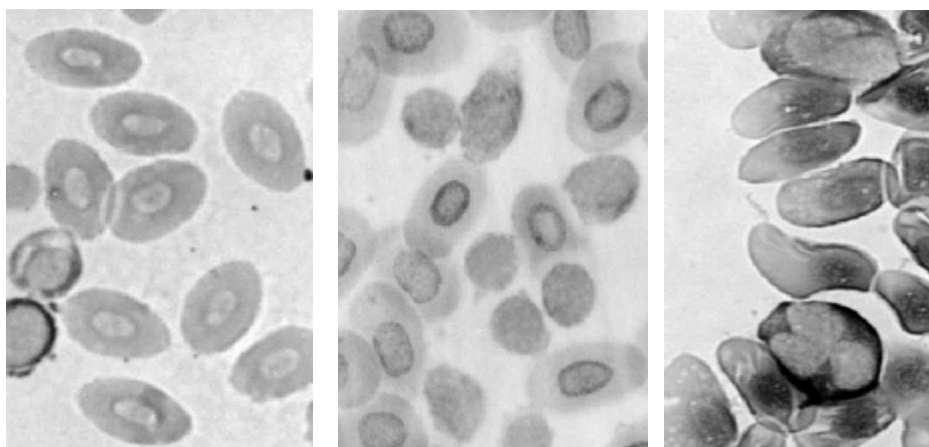


Рис. 4. Крупные клетки на краю мазка, мелкие – в середине

Лучше двигаться по самым тонким, наиболее прозрачным местам мазка, где хорошо просматривается структура клеток. Особенно важно придерживаться указанного правила подсчета при патологических изменениях крови, выявить которые при этом будет значительно легче.

Процентное соотношение клеток белой крови просчитывают с помощью 11-клавишного счетчика для лейкоцитарной формулы. Изучая белые клетки, учитывают сдвиги ядер нейтрофилов – **индекс сдвига ядер** (рис. 5).

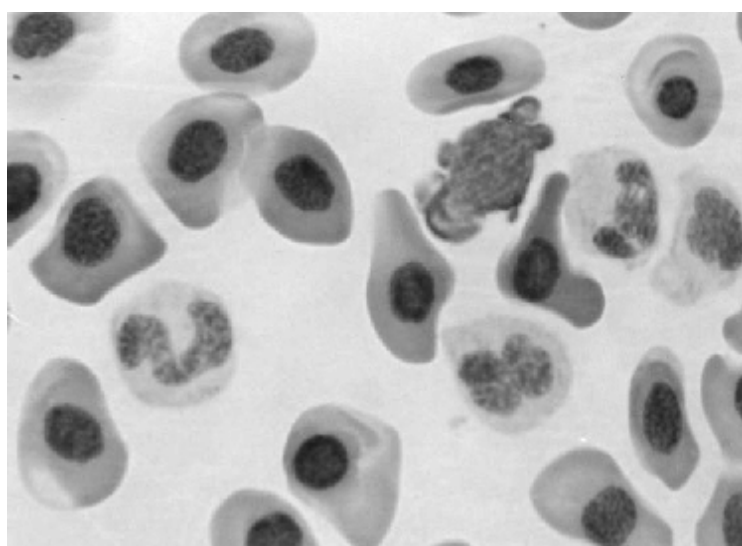


Рис. 5. Сдвиг ядер влево. Преобладают молодые формы нейтрофилов

Повышение процента незрелых нейтрофильных клеток в периферической крови называется **сдвигом влево**. Снижение количества палочкоядерных нейтрофилов и присутствие гиперсегментированных ядер определяется как **сдвиг вправо**. Индекс сдвига рассчитывается по формуле:

$$\text{Индекс сдвига ядер} = \frac{\text{незрелые лейкоциты} + \text{палочкоядерные}}{\text{сегментноядерные}}$$

Для выяснения отклонения в гематологических параметрах применяется показатель индекса сдвига лейкоцитов (**ИСЛ**).

$$\text{Индекс сдвига лейкоцитов} = \frac{\text{гранулоциты}}{\text{сегментноядерные}}$$

ИСЛ у здоровых осетров 0,25-0,40; у карпов – 0,30.

Основные структурные изменения в клетках

Сегментация ядра. Явление чаще обнаруживают в нейтрофилах. Ядро разделяется на несколько сегментов, иногда соединенных между собой. Появление гиперсегментированных форм рассматривают как признак дегенерации. Такие ядра в нейтрофилах появляются при анемиях различного происхождения (недокорм, авитаминоз, действие химических факторов). Размер нейтрофилов с гиперсегментированным ядром может быть увеличен (гигантские гиперсегментированные формы) (рис.6).

Сегментация может сочетаться с пикнозом, хроматинолизом и вакуолизацией ядра и цитоплазмы.

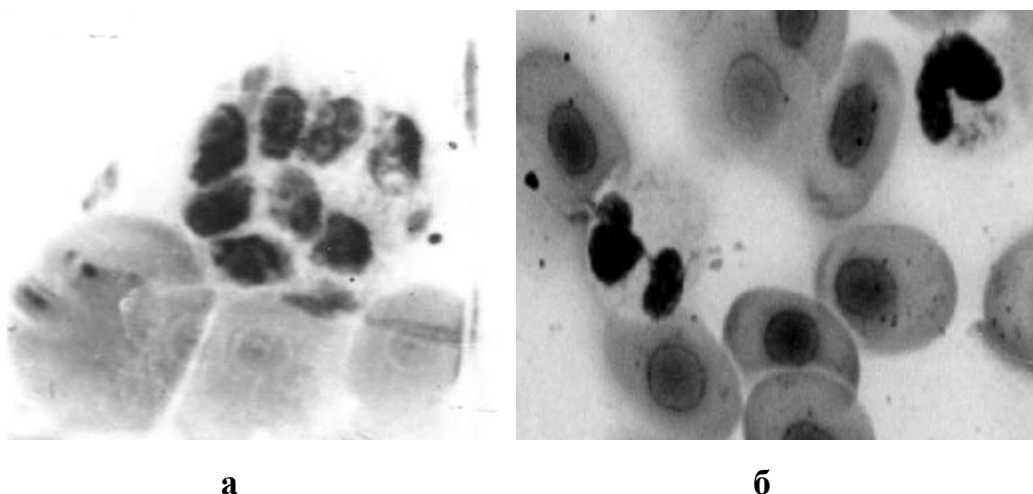


Рис. 6. Гиперсегментация ядра. Увеличение размера нейтрофила
а – норма, б - палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы.

Хроматинолиз (выщелачивание). Хроматин ядра клетки распадается, теряя свою нормальную структуру, и в конечном итоге растворяется вообще. Такое ядро, сохраняя свои контуры, на мазке имеет вид неокрашенного белого пятна, окруженного цитоплазмой. Далее наступает лизис, то есть распад всех ядерных структур (рис.7).

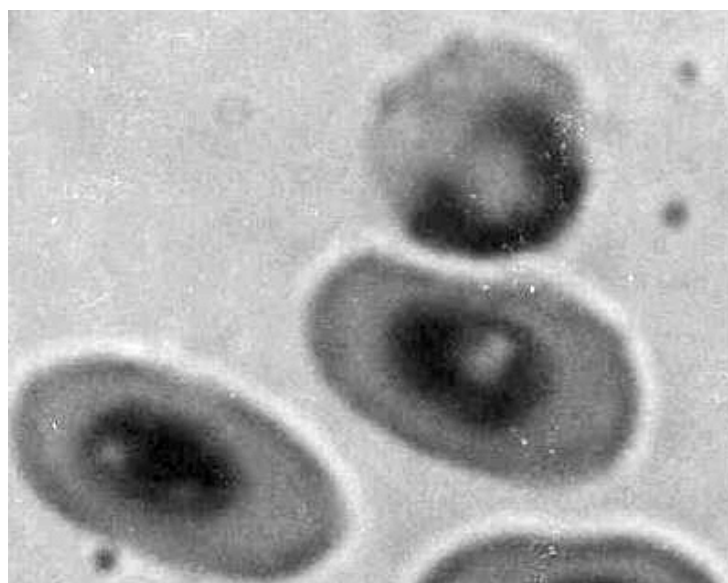


Рис. 7. Хроматинолиз (клетка сверху). Кариолиз (две нижние клетки)

Кариолиз (частичный лизис). Растворяется лишь часть ядра с сохранением его нормальной структуры. В местах растворения ядро теряет способность окрашиваться основными красителями. Контуры ядра нечеткие, размытые.

Фрагментоз (тельца Жолли). От ядра отделяется ряд его фрагментов в виде хроматиновой субстанции. Иногда у них остается связь с ядром посредством тонких нитей базихроматина. Тельца Жолли — структуры округлой формы, от 1 до 10 шт. — встречаются в ортохромных или полихроматофильных эритроцитах и расположены в центре его, а также эксцентрично (рис.8).

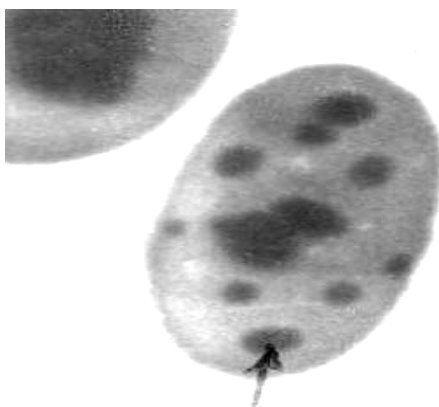


Рис. 8. Фрагментоз (тельца Жолли).

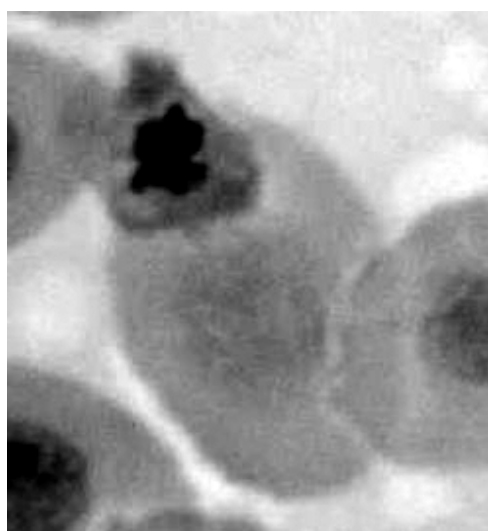


Рис. 9. Пикноз. Клетка малого размера. Уплотнение ядра

Кариорексис. При сохранении ядерной оболочки идет распад ядра на отдельные части различной величины. Эти фрагменты не связаны между собой – округлой формы и резко пикнотичные, бесструктурные, темные образования (рис. 10).

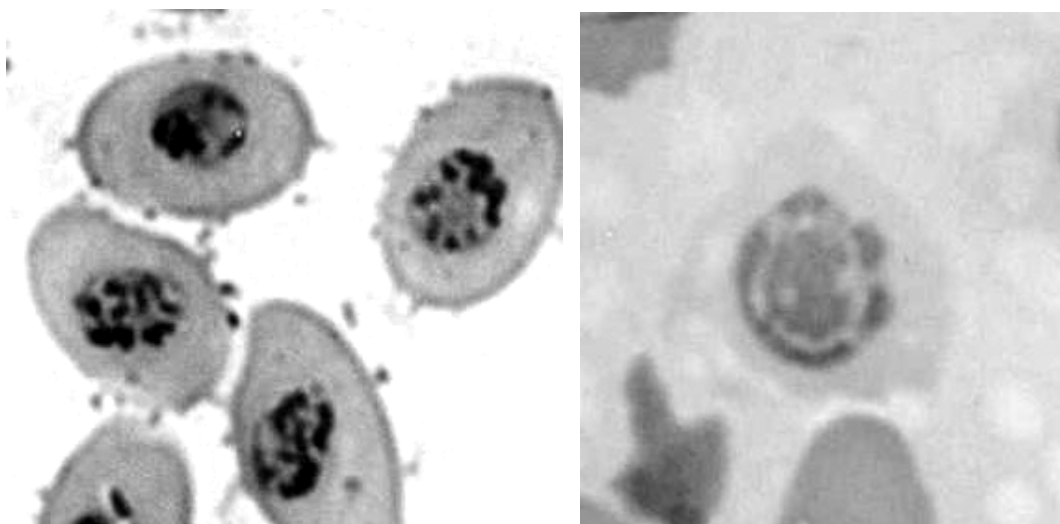


Рис. 10. Кариорексис. Распад ядра на фрагменты при сохранении его Оболочки

Цитолиз – процесс, заключающийся в распаде клетки. Цитоплазма чаще отсутствует. Ядро теряет свою обычную структуру, контуры его расплывчатые. В тяжелых случаях можно обнаружить только остатки ядра и зернистость (рис. 11).

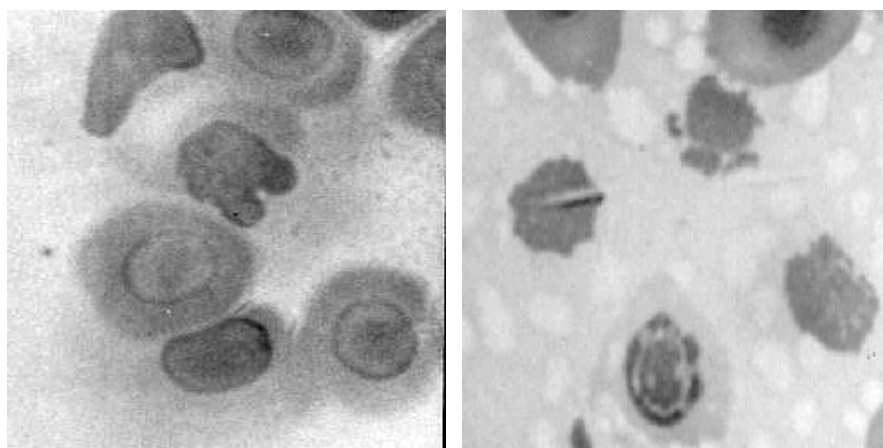


Рис. 11. Цитолиз. Контур ядра расплывчатый. Цитоплазма отсутствует

Вакуолизация встречается чаще в цитоплазме, иногда — в ядре. Возможно образование вакуолей в обоих случаях одновременно. Наличие ее в ядре указывает на более глубокие изменения в клетке и на тяжесть патологического процесса. Размер вакуолей различный. В одних клетках можно видеть крупные единичные вакуоли, в других — мелкие, но в большем количестве. Вакуолизация чаще сочетается с другими структурными изменениями клетки — лизисом, пикнозом, гипохромазией и другими (рис. 12).

Гипохромазия отражает нарушение процессов гемоглинообразования и заключается в малом содержании дыхательного пигмента в эритроцитах. Наблюдается, как правило, при анемиях (рис. 13).

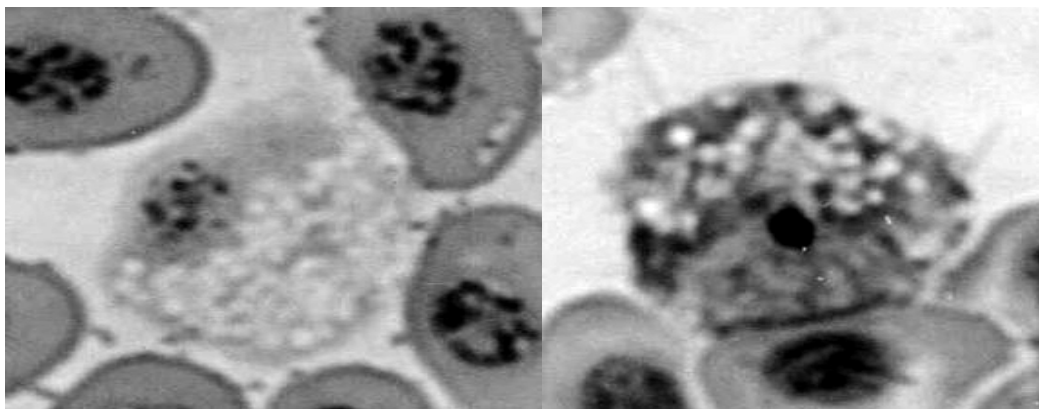


Рис. 12. Вакуолизация цитоплазмы нейтрофилов

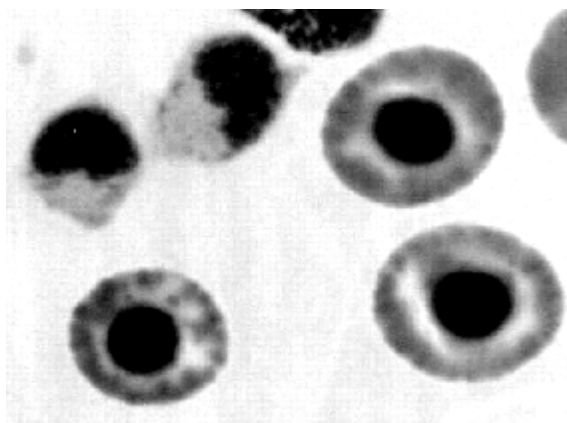


Рис. 13. Гипохромазия. Низкое содержание гемоглобина в цитоплазме эритроцитов

Структурные изменения в клетках крови встречаются при различных патологических процессах: инфекционные заболевания, воздействие химических факторов, при отклонениях в позах крови. Они бывают настолько значительны, что нарушают основные, жизненно важные для организма функции крови.

В норме количество патологически измененных клеток не превышает 5% .

Цитометрические исследования. На каждом мазке крови с помощью окулярмикроскопа следует измерять не менее 200-500 зрелых эритроцитов, используя иммерсионный объектив микроскопа. Площадь поверхности эритроцитов вычисляют по формуле А.А.Чижевского для эллипсоидных эритроцитов:

$$S=2ab+lh, \quad (1)$$

где $h=1,8 \pm 0,0915 (d - 7,5)$;

$$l=1,57 (2a+2b);$$

a и b — длинная и короткая полуоси эритроцитов, мкм;

h — высота (толщина) эритроцита, мкм;

l — длина эритроцита, мкм;

d — длинный диаметр эритроцита.

Метод служит для определения степени анизоцитоза, чтобы диагностировать анемию: к примеру, появление макро- и мегалоцитов при пернициозной анемии.

В результате проведения гистологических исследований воспроизводительной системы разных видов рыб изучены патологические нарушения, свидетельствующие о влиянии антропогенных факторов на

разные этапы гаметогенеза, что позволяет обосновать прогноз репродуктивного состояния популяций рыб. Итогом экспериментов и натуральных наблюдений на примере осетровых получена полная морфологическая картина особенностей дегенерации половых желез и значительных перестроек в обмене веществ в условиях нарушения миграционного поведения. Установлено, что резорбция трофических веществ икры наблюдается в течение 2-3 месяцев, скопления пигментов, свидетельствующие о прошедшей резорбции и неучастии рыб в воспроизводстве и нересте, сохраняются на ястыке более двух лет.

У самцов осетровых разрыхление и обильная гиперемия генеративной ткани, лизис половых клеток наблюдаются в течение 2-3 месяцев. По истечении большого срока резорбированные семенники практически не отличаются от нормальных во II стадии зрелости. Это затрудняет диагностику прошедшей дегенерации и неучастие в нерестовой кампании самцов по пробам, собранным в море в другие сезоны года. Знание этапов резорбции яичников и семенников позволяет определить количество рыб, обитающих в море, не нерестившихся в текущем, а для самок – и в предыдущем году. Глубина изменений гонад свидетельствует о том, что адаптивно обусловленный процесс резорбции при отсутствии условий для нереста не безвреден для физиологического состояния рыб и их повторного созревания.

Ежегодный мониторинг за функциональным состоянием репродуктивной системы позволил выявить различные типы нарушений процессов развития гонад разных видов рыб, которые свидетельствуют о неблагоприятном воздействии окружающей среды.

Так, у осетровых отмечены

- задержка в развитии гонад на I-II стадии зрелости у 7% самок осетра в возрасте 9-13 лет;
- развитие кист и выростов на генеративной ткани у 1-3% взрослых самок;
- необратимое жировое перерождение яичников в 16-20 лет;
- гермафродитизм у 4% половозрелой популяции осетра;
- асинхронность развития ооцитов на ястыке.

Большинство патологий состояния гонад, выявленных у осетровых в море, является прямым доказательством генотоксичного влияния среды обитания на развитие аномалий (Корниенко и др., 1998).

У самцов осетровых морфологические и функциональные изменения характеризуются гиперемией, кистообразным и жировым перерождением гонад.

В 1992-1996 гг. (период значительного антропогенного пресса) в море после окончания нерестового периода наблюдали значительное (до 30% от нерестовой популяции) число осетров, резорбирующих половые клетки.

Таким образом, гистологическое исследование гонад подтверждает неучастие в завершении нерестовой миграции и процессе воспроизводства 20-40% производителей осетра, что значительно снижает возможный объем промысловых уловов и возможность пополнения популяций молодью. Использование гистологических и биохимических методов исследования других органов и тканей позволяет наблюдать картину морфофункциональных нарушений у части популяций разного вида рыб Азово-Черноморского бассейна, что свидетельствует о неблагоприятной

экологической обстановке в разные периоды жизни. Это вселяет научно обоснованную тревогу за сохранность некоторых видов гидробионтов.

Многолетние морфофункциональные исследования гистологической структуры тканей, органов, систем органов осетровых, судака, леща, тарани, пиленгаса показали, что многие из них имели значительные патологические изменения в репродуктивном комплексе, структуре жабр, почек, печени, крови, а именно: гиперплазия многослойного и дыхательного эпителия в сочетании с деформацией ламелл и филаментов жабр, локальный гломерулонефрит туловищных почек, мышцы с признаками дистрофических изменений (судак), жировая и гидropическая дистрофия печени, отсутствие границ между красной и белой пульпой в селезенке, дегенерация отдельных половых клеток, патология клеток крови.

Патоморфологические нарушения приводят к изменению процента репродуктивно полноценных рыб и темпа созревания, снижению плодовитости, нарушению обмена веществ. Знание морфологических отклонений позволяет прогнозировать репродуктивный потенциал популяций рыб.

В конце 80-х годов под влиянием загрязнения у азовских осетровых появилось заболевание – коллагеноз. В начале болезни в кровяном русле отмечалось повышенное содержание индикатора аллергии – эозинофилов (у азовской севрюги до 30% при норме 6-7%), тогда как другие симптомы еще не улавливались. Через 2-3 года эозинофилы, снижаясь почти до нормы (5-9%) в периферической крови, накапливаются в печени, где идет развитие коллагеноза. Это своеобразное заболевание является следствием патологии обмена веществ и функции желудочно-кишечного тракта. Морфологически оно характеризуется дистрофией гепатоцитов, гистио-лимфоцитарной инфильтрацией и фиброзом портальной стромы печени. После нарушения структуры печени процесс постепенно захватывает все кроветворные органы,

вызывая их дегенерацию. В последнюю очередь наступают изменения в гонадах. В этих условиях кровь, являясь тканью, сохраняющей гомеостаз, претерпела ряд значительных патологических изменений: ядра эритроцитов были вакуолизированы, наблюдалась их инвагинация, полиморфизм, состояние пикноза; ярко выражена гипохромазия и вакуолизация цитоплазмы; форма и размер клеток сильно варьировали.

В восстановительный период было отмечено увеличение количества эритроцитов. Частые случаи митотического деления этих клеток и появление в периферическом русле клеток без ядер следует рассматривать как варианты приспособительных реакций организма, обеспечивающих его выживание в неблагоприятных условиях. Гипохромазия эритроцитов сопровождалась увеличением их количества в периферическом русле. С наращиванием числа полноценных эритроцитов число гипохромных клеток в крови снижается. Используя гематологические характеристики, удалось установить, что в первую очередь восстанавливается физиологический статус – нормализуется содержание гемоглобина, восстанавливается нормальная лейкоцитарная формула. Сложнее идет нормализация клеточных структур того или иного органа в целом. Кроветворные органы и гонады восстанавливаются в последнюю очередь. В 2000 г. лейкоцитарная формула у осетровых рыб пришла в норму. В селезенке наблюдалось большое количество молодых лимфоцитов, что свидетельствовало о восстановлении ее функции. В почках еще отмечались изменения эпителия почечных канальцев. Среди гемопоэтической паренхимы были видны инкапсулированные участки из разросшейся соединительной ткани (коллагена). В печени некроз отмечался у единичных особей. У большинства рыб видны зоны регенерации из 5-20 клеток. Отмечаются патологические изменения в структуре развивающихся клеток. Основные патологии касались деформации ооцитов протоплазматического роста яичников у самок и разрастания коллагена

интерстициума семенников у самцов, что, возможно, связано с очередной волной вторичного загрязнения водоемов.

2. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА ПРОМЫСЛОВЫХ РЫБ

Оценка воздействия антропогенного загрязнения водной среды на функциональные качества обитающих в ней промысловых рыб, их репродуктивную биологию и, соответственно, способность к воспроизводству биоресурсного потенциала является актуальной и в то же время сложной для решения научно-теоретической и практической задачей, требующей использования адекватных информативных метаболических показателей. В качестве биомаркеров негативного повреждающего воздействия компонентов антропогенного загрязнения на ихтиообъекты используются методы оценки активности детоксикационных систем печени – микросомальных монооксигеназ, отвечающих индуктивным эффектом на воздействие липофильных ксенобиотиков, а также комплекс методов - характеристик основных антиоксидантов тканей, функционально тесно связанных с проявлением репродуктивных качеств рыб.

Использование системы биохимических показателей позволяет оценить динамику репродуктивного качества разных видов рыб в изменяющихся условиях загрязнения (в том числе хронического). Она нашла применение в экспертной системе «Азов». В качестве примера можно привести материалы по корреляции используемых ксенобиохимических, токсикологических данных и динамики репродуктивных нарушений у осетровых рыб (русский осетр и севрюга) Азовского моря в долговременном (1990-2002 гг.) физиологическом мониторинге их популяций (Дудкин и др., 1997, 1999, 2000, 2002; Kornienko, Dudkin, Lodzhichevskaya, 1997; Зиновьев и др., 1998; Dudkin, Kornienko, Lozhichevskaya, 1999; Дудкин, 2000а,б, 2001а,б,с; 2002а,б; Dudkin, Kornienko, 2001; Dudkin et al., 2001)

2.1. Определение содержания цитохромов B5 и P450 (по Omura, Sato, 1964)

Определение содержания цитохрома B5 основано на измерении разницы в поглощении окисленной и восстановленной форм гемопротейда, а цитохрома P450 – на измерении величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома P450 с окисью углерода при 450 нм.

Оборудование:

- спектрофотометр СФ – 46;
- центрифуга (до 18 000 об./мин) с обязательным охлаждением ротора до 0-4° С.

Реактивы:

- 15 %-ный раствор хлорида калия;
- 0,1 М Трис-НСl буфер, рН 7,4;
- 0,04 N CaCl₂;
- концентрированный раствор муравьиной и серной кислот.

Ход определения. Измерение содержания цитохромов B5 и P450 проводят в суспензии микросом (100-200 мкл трис-НСl буфер рН 7,4 и 1-2 мг белка в 1 мл) на спектрофотометре (по двухлучевой схеме).

В каждую из кювет вносят по 4 мл инкубационной смеси. Определение оптической плотности проб проводят в диапазоне длин волн 450-500 нм. Контроль – несколько кристаллов дитионита для записи дифференциального спектра цитохрома B5. При этом максимум поглощения имеет место при 409 нм, а минимум - при 428 (ΔОП₄₀₈₋₄₂₈), что служит показателем содержания цитохрома B5.

Содержание цитохрома B5 в микросомной фракции рассчитывают с помощью коэффициента молярной экстинкции $164 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (Omura, Sato, 1964).

Измерение содержания цитохрома P450 проводят по двухлучевой схеме. После записи нулевой линии через кювету с пробой в течение ~1 минуты пропускают угарный газ CO, полученный смешиванием концентрированных растворов муравьиной и серной кислот. Выделяющийся в ходе реакции газ очищают, пропуская через щелочной раствор пирогаллола. Затем в обе кюветы спектрофотометра добавляют несколько кристаллов дитионита и записывают дифференциальный спектр. Разница между максимумом поглощения при 450 нм и минимумом при 475 или 490 нм является показателем содержания гемопротеида в микросомах.

Содержание цитохрома P450 рассчитывают по коэффициенту молярной экстинкции $91 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ (Omura, Sato, 1964) и выражают в нМоль гемопротеида в 1 мг белка микросом.

2.2. Определение содержания жирорастворимых витаминов (по Tailor et al., 1976)

Оборудование:

- спектрофлуорофотометр RF-510 (Shimadzu, Япония);
- водяная баня на 70 °С;
- центрифуга (1000 об./мин);
- пробирки 10 мл;
- пипетки 1-10 мл.

Реактивы:

- дистиллированная вода;
- этиловый спирт 96°;
- 25%-ный водный раствор аскорбиновой кислоты;.
- 10 N раствор КОН;
- гексан марки ОСЧ или ХЧ.

Для определения жирорастворимых витаминов и каротиноидов из образца ткани готовят гомогенат на дистиллированной воде в соотношении 1:3 (Tailor et al., 1976). В пробирку с подготовленной смесью этилового спирта (1 мл) и 25%-ного водного раствора аскорбиновой кислоты (0,5 мл) вносят 1 мл полученного гомогената. После предварительного прогрева проб до 70 °С в течение 5 минут в смесь приливают 1 мл 10 N раствора КОН и инкубируют в течение 30 минут при 70⁰С для омыления липидов, мешающих определению витаминов и каротиноидов. По окончании инкубации пробы охлаждают в течение ~ 5 минут, помещая штатив в воду комнатной температуры, прибавляют 4 мл гексана, энергично встряхивают смесь до однородной эмульсии в течение 1 минуты, после чего центрифугируют 15 минут при 1000 об./мин для отделения гексановой фракции, содержащей каротиноиды и витамины.

Для определения каротиноидов гексановую фракцию спектрофотометрируют при длинах волн 450 и 475 нм на СФ-46.

Содержание восстановленных каротиноидов типа β-каротина определяют по формуле:

$$C_{\text{кар}} \text{ (мг/г сырой ткани)} = 16 E_{450} / M_{\text{нав}}, \text{ мг}, \quad (2)$$

где $C_{\text{кар}}$ – содержание каротиноидов в ткани;

E_{450} - оптическая плотность раствора при длине волны 450 нм;

$M_{\text{нав}}$ – масса навески ткани, использованной в анализе, мг.

Содержание ксантофиллов определяли по формуле:

$$C_{\text{ксан}} \text{ (мкг/г сырой ткани)} = 108,5 E_{475} / M_{\text{нав}}, \text{ г}, \quad (3)$$

Обозначения те же, что в формуле 2.

Определение токоферола в гексановой фракции осуществляют на спектрофлуорофотометре RF-510 (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 286 нм и длине волны испускания 330 нм. Содержание ретинола в этой же фракции спектрофлуориметрируют при длине возбуждения 325 нм и длине испускания 470 нм.

После построения калибровочной кривой как для токоферола, так и для ретинола содержание витаминов рассчитывают по формулам:

$$\text{токоферол} - [(0,0016E^2 + 0,2044E) \times 4] \text{ мкг/г замороженной ткани}; \quad (4)$$

$$\text{ретинол} - [(E/24,92 - 0,25) \times 4] \text{ мкг/г замороженной ткани}. \quad (5)$$

Полученные данные обрабатывают статистически с использованием стандартных пакетов программ Microsoft Statistica и Microsoft Excel.

2.3. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД)

Оборудование:

- спектрофотометр СФ-46;
- центрифуга (рефрижераторного типа, 6000 об./мин);
- пробирки стеклянные;
- пробирки центрифужные;
- мерные цилиндры 50 –100 мл.

Реактивы:

- фосфатный буфер рН 7,8;
- этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), 0,05 М;
- фосфорнокислый калий однозамещенный;
- этиловый спирт;
- хлороформ;
- феназинметосульфат;

- тетразолий нитросиний.

- НАДН.

Ход анализа. Активность СОД регистрируется по интенсивности ингибирования источником фермента восстановления нитросинего тетразолия.

Навеску ткани 40 мг гомогенизируют в 2 мл фосфатного буфера (рН 7,8) с добавлением 0,05 М ЭДТА. Лизат получают, добавляя к 1 мл гомогената 300 мкл K_2HPO_4 и 0,5 мл смеси хлороформ:этанол (3:5). Гомогенат обрабатывают в ледяной бане с последующим центрифугированием при 6000 об./мин в течение 15 минут. Работают с супернатантом. Реакционная смесь содержит 0,3-0,2 мл лизата, $3 \cdot 10^{-3}$ М феназинметосульфата, $1,25 \cdot 10^{-5}$ М тетразолия нитросинего.

В опытных и контрольных пробах реакцию запускают 0,1-0,15 мл 0,1 мМ НАДН. Инкубацию ведут в течение 10 минут при 20-22 °С.

Оптическую плотность регистрируют при 540 нм против смеси, содержащей все компоненты, кроме НАДН. За единицу активности СОД принимают такое количество фермента, которое, будучи добавлено к смеси, уменьшает скорость неингибированной реакции на 50%. Результат рассчитывают в удельных единицах активности фермента на 1 мг белка.

2.4. Определение активности катепсина Д (по Динглу, 1980)

Оборудование:

- спектрофотометр СФ-46;
- центрифуга (3000 об./мин);
- пробирки стеклянные;
- пробирки центрифужные;
- мерные цилиндры 50 –100 мл.

Реактивы:

- ацетатный буфер рН 2,8; 3,2;
- 0,5 N NaOH;
- 5 % ТХУ;
- 2,5 % раствор гемоглобина;
- реактив Фолина.

Метод определения активности катепсина Д основан на его способности гидролизовать гемоглобин с образованием пептидов, растворимых в присутствии трихлоруксусной кислоты.

Гомогенаты готовят на дистиллированной воде при разной концентрации тканей: гонады и мышцы – 30%, печень и икра – 10. Реакционная смесь состоит из 0,5 мл 0,35 М ацетатного буфера (рН 2,8 для сыворотки, рН 3,2 – для других тканей), 0,5 мл гомогената и 1 мл 2,5% гемоглобина. Инкубацию проводят при 37 °С в течение 60 минут при встряхивании. Реакцию останавливают, добавляя 2 мл 5%-ной ТХУ, затем пробы центрифугируют при 3000 об./мин в течение 15 минут. К 1 мл супернатанта добавляют 2 мл 0,5 N NaOH для нейтрализации ТХУ и 0,5 мл реактива Фолина. Количество белка и ТХУ-растворимых продуктов катепсинового протеолиза определяют методом Лоури. Активность фермента выражают в мкМ тирозина/(мг белка×час).

2.5. Определение активности ДНК-азы и РНК-азы*Оборудование:*

- термостат (37° С);
- центрифуга (6000 об./мин);
- спектрофотометр СФ–46;
- пробирки;

- мерные колбы 50 - 200 мл;
- пипетки 1-10 мл.

Реактивы:

- ацетатный буфер рН 5,0;
- 0,1 %-ный раствор дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот;
- 0,5 N хлорная кислота;
- 0,25%-ный раствор уранилнитрата.

Активность кислых нуклеаз определяют спектрофотометрическим методом.

Субстратом являются 0,1%-ные растворы соответствующих нуклеиновых кислот на ацетатном буфере рН 5,0 – для дезоксирибонуклеиновой и рН 5,2 для рибонуклеиновой кислоты. В пробирки вносят по 0,8 мл исследуемой ферментной вытяжки, смесь инкубируют 15 минут в термостате при 30 °С. Реакцию останавливают, добавляя 2 мл осадителя. При определении активности ДНК-азы это 0,5 N раствор хлорной кислоты, а в случае РНК-азы – 0,25%-ный раствор уранилнитрата на 0,5 N хлорной кислоте. Для лучшего осаждения непрореагировавших нуклеиновых кислот пробы выдерживают в холодильнике в течение 1-1,5 часов. Образцы центрифугируют 15 минут при 4000 об./мин. В чистые пробирки отбирают по 1 мл надосадочной жидкости, добавляют 5 мл бидистиллированной воды и измеряют их оптическую плотность при 260 нм. Активность нуклеаз выражают в условных единицах активности ΔE_{260} в 1 мг белка. Содержание белка в пробах определяют по методу Лоури.

Использование методик для изучения ксенобиохимических изменений в организме рыб показало, что в годы интенсивного загрязнения Азовского моря (1992-1994 гг.) у русского осетра нерестовой популяции в море

отмечалась массовая (до 30% рыб) тотальная резорбция икры и молок, а содержание цитохрома P450 в микросомах печени повышалось при созревании до 12-17 нМоль/мг белка микросом. При этом в печени и других тканях происходило значительное снижение липорастворимых витаминов-антиоксидантов (ниже 10-15 мкг/г сырой ткани). После системного кризиса экономики России в связи с распадом СССР, снижения промышленного и сельскохозяйственного производства и, соответственно, уровня сброса загрязненных стоков в море (1997-2000 гг.) количество аномалий репродуктивной системы и процессов созревания у осетра снизилось до 5-8 %, содержание цитохрома P450 в микросомах печени не превышало 2-7 нМоль/мг белка микросом при возрастании количества витаминных антиоксидантов в тканях нерестовых мигрантов. Знание биохимических составляющих позволяет изучить механизмы возникновения патологий воспроизводства.

3. ФИЗИОЛОГИЯ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА ОСЕТРОВЫХ РЫБ

3.1. Методы изучения поведенческих реакций молоди осетра на «запечатленный» химический стимул

Изучение закономерностей нерестовых миграций осетровых рыб – одной из наиболее ярких форм мотивационного поведения – одновременно является необходимым элементом при составлении прогноза их промыслового вылова. Воздействие рыбоводства на дальнейшее течение физиологических процессов разводимых видов осетровых, в том числе и на их поведение, остается одним из малоизученных вопросов. Наблюдающееся изменение характера миграционного поведения нерестовой части популяций осетровых рыб, сформированных целиком из особей «заводского» воспроизводства, еще раз подтверждает тезис, что направления адаптаций реализуются в процессе индивидуального развития под воздействием внешних факторов и в генофонде не заложены (Марти, 1980). При этом ключевую роль играет не «инстинкт дома», а «условия дома» и только тогда, когда они обеспечивают надежную воспроизводимость вида.

Осетровые рыбы весьма пластичны к факторам внешней среды. Они способны выживать во многих неблагоприятных для вида условиях вследствие высокой адаптационной способности, возникшей в процессе эволюции и реализуемой через нейроэндокринные механизмы регуляции. Система адаптации у рыб созревает в онтогенезе, но работ, связанных с изучением роли раннего онтогенеза в реализации видовых приспособлений у осетровых рыб, сравнительно немного. Таким образом, в современный период, когда в Азовском бассейне единственным способом сохранения этих ценных в промысловом отношении рыб остается их воспроизводство на рыбоводных предприятиях, изучение физиологических механизмов адаптаций в раннем онтогенезе приобретает особую актуальность.

У высших животных (теплокровных) определенные функциональные механизмы, обуславливающие их приспособительную деятельность и поведение, складываются в сравнительно короткий период раннего пре- и постнатального развития, называемого «критическим». Менее всего разработана эта проблема в отношении низших животных, в частности, в пределах класса рыб: здесь функциональные основы поведенческих стереотипов в раннем онтогенезе изучались менее интенсивно или почти не изучены. Одновременно принято считать, что у рыб влияние нервной системы на поведение в ранний период онтогенеза весьма ограничено вследствие незрелости центральных механизмов регуляции, в том числе и нейроэндокринного звена (Павлов и др., 1998). Методика регистрации поведенческих реакций молоди осетра на «запечатленный» ранее химический стимул позволила получить доказательства влияния нервной системы осетровых рыб на поведение, начиная с самых ранних этапов онтогенеза.

Участие нервных механизмов реагирования на факторы среды в раннем онтогенезе осетровых рыб и роль этих факторов в модуляции последующего поведения изучалась нами на модели импринтинга химических стимулов личинками русского осетра *Acipenser güldenstädti* Br. Импринтинг как наиболее простая форма реализации «нервной памяти» поддается количественной оценке и известен у рыб (Виноградова, Мантейфель, 1984). У лососевых рыб избирательная адаптация к химическим раздражителям (обонятельный импринтинг) появляется, в основном, в период смолтификации и в дальнейшем реализуется в ходе нерестовых миграций (Hasler, Scholz, 1983; Tilson et al., 1994). Вероятно, что и осетровые, поскольку они обладают развитой системой химического тестирования среды, могут «запечатлять» эти сигналы в определенный период онтогенеза и в дальнейшем использовать их в целях ориентации.

Оборудование:

- экспериментальный аквариум с системой оборотного водоснабжения;
- микрокомпрессоры;
- бассейны или аквариумы для выдерживания рыб;
- реактивы:
- вещество для определения чувствительности рыб к химическим раздражителям (морфолин);
- активированный уголь.

Непосредственно после выклева предличинок осетра помещают в заводские бассейны с проточной водой. В качестве модельного вещества для "запоминания" используется морфолин-одорант в очень малых и экологически безопасных концентрациях (Виноградова, Мантейфель, 1984). Его вносят по мере вымывания из бассейнов с определенной скоростью так, чтобы конечная его концентрация составляла 10^{-10} - 10^{-8} М. Срок экспозиции составлял 4 суток (от 36-й до 40-й стадии развития предличинки), 6 суток, (40-45-я стадии), 10 суток (36-45-я стадии), 18 суток (36-я стадия- 8-суточная личинка). Помимо этого, предусматривают варианты, где рыб приучают к морфолину после перехода на экзогенное питание (45-я стадия) в течение 8 и 30 суток.¹

После экспозиции рыб пересаживают в бассейны с проточной водой без следов морфолина, где и содержат от 3 недель до 1,5 месяцев. Молодь тестируют группами по 5-7 штук в экспериментальном аквариуме размером 46x23x20 см с непрерывно действующей системой оборотного водоснабжения. Воду очищают с помощью гравия и активированного угля (Касумян, Пономарев, 1986). Аквариум условно разделен на две половины: стартовую и опытную (тестовую). В опытной части аквариума расположены

¹ Наименование стадии развития приведено по Детлаф (Детлаф и др, 1981).

два отсека с параллельными потоками воды, подаваемыми через узкие трубки (рис. 14). Рыбы адаптируются к условиям аквариума при включенной системе обратного водоснабжения и открытых кранах водоподдачи в опытной части аквариума, что в эксперименте позволяет устранить реакцию рыб на включение и выключение потоков. На стимульном интервале один из потоков в произвольном порядке сменяет раствор химического вещества (морфолин 10^{-8} или 10^{-9} М). Концентрации веществ применяют в восходящем порядке.

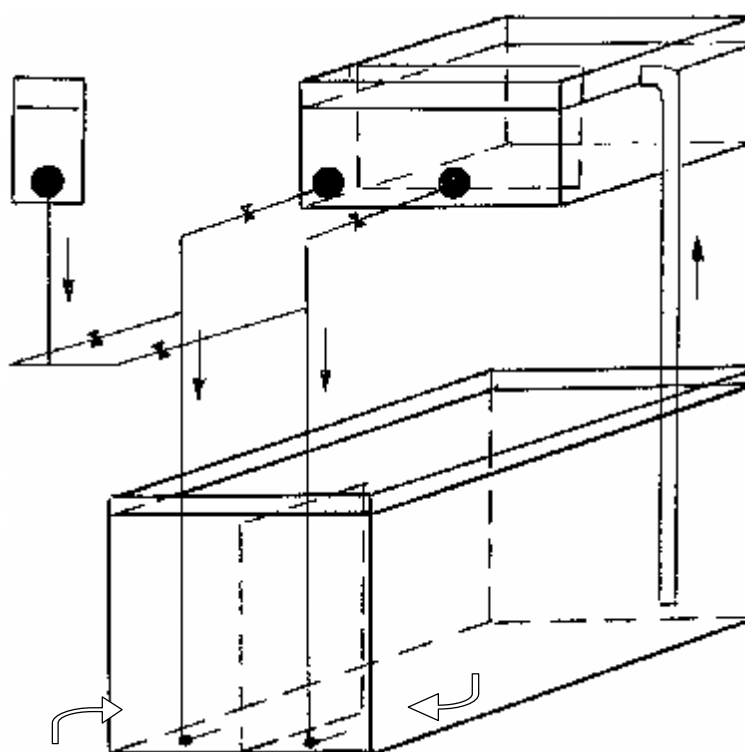


Рис. 14. Схематическое изображение экспериментальной установки для изучения поведения молоди осетра

Светлыми стрелками обозначены опытные отсеки аквариума. Темные стрелки - направление движения воды и тестируемого раствора (морфолин). Вверху - резервуар для очистки воды. Слева - сосуд с раствором морфолина.

В процессе тестирования молоди осетра, когда оценивают ее реакцию на «запечатленный» ранее химический стимул, параметры двигательной активности регистрируют, подсчитывая количество рыб в тестовой части

аквариума (в опытном и контрольном отсеках отдельно) на фоновом, стимульном и, в ряде случаев, постстимульном интервалах (Солуха, 1989).

Длина интервалов должна быть одинакова для экспериментов одной серии (3 или 4 минуты) и не иметь промежутков. На фоновом интервале в отсеках в экспериментальной части аквариума через пипетки, расположенные у дна, непрерывно подается вода. На стимульном интервале в опытном отсеке (он выбирается произвольно) на личинок воздействуют тем же химическим раздражителем, что и на подготовительном этапе. Его подают через пипетки вблизи дна аквариума, в то время как в контрольном отсеке таким же образом поступает вода.

Промежуток между отсчетами (шаг) регистрируемых параметров выбирают один раз в начале эксперимента. Величина его может зависеть от величины рыб и аквариума. Для большинства аквариумных рыб промежуток составляет 5-10 с. В данном случае для молоди осетровых рыб, размер которых к началу опытов составлял 4-6 см и более, шаг принят равным 15 с. Таким способом на исследуемых промежутках регистрируют временное изменение числа рыб, находящихся в отсеке.

Поведенческую реакцию рыб можно оценивать несколькими способами (Солуха, 1989). В данном случае приведены два способа.

1. О реакции судят по количеству рыб (в процентах по отношению к фону) в опытном отсеке. Результаты вычисляются по формуле:

$$\frac{A_1 \cdot 100}{A}, \quad (6)$$

где A — число рыб в отсутствии сигнала;

A_1 — число рыб при подаче сигнала.

Такой метод оценки дает общую картину реакции. В то же время его основным недостатком является невозможность оценки слабых (пороговых)

изменений двигательной активности рыб, а также изменений поведения рыб в процессе тестирования.

2. Каждый эксперимент (реализация) на бумаге (табл. 2) представляет собой последовательное изложение регистрируемых параметров (число рыб, **N**). После определения среднего значения на фоновом интервале все значения отсчетов на стимульном (и постстимульном) интервале делят на свое фоновое среднее и таким образом определяют значения частных показателей реагирования для фоновых и стимульных интервалов (Солуха, 1989).

Таблица 2. Протокол первичной обработки результатов тестирования молоди осетра

№	К для фоновых интервалов (интервал 15 с)													К_ф
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	
1.	2,5	0	0	0	5	0	0	0	2,5	0	0	2,5	0	
2.	1,6	1,6	0	1,6	3,2	1,6	0	1,6	1,6	0	0	0	0	
3.	0	1,2	1,2	0	1,2	0	1,2	1,2	1,2	2	0	2,5	1,2	
4.	2,2	0	2,2	1,1	0	1,1	2,2	1,1	1,1	2,2	0	0	3,3	
n...	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2	2	0	1	
	1,3	0,6	0,7	0,7	1,9	0,5	0,7	1	1,5	1,2	0,4	1	1,1	1
	К для стимульных интервалов (интервал 15 с)													К_{ст}
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	
1.	5	2,5	5	0	2,5	2,5	2,5	2,5	0	5	0	2,5	0	
2.	3,2	3,2	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	3,2	0	1,6	1,6	
3.	1,2	3,7	2,5	1,2	1,2	0	1,2	1,2	0	2,5	2,5	2,5	2,5	
4.	1,1	1,1	1,1	1,1	2,2	0	0	1,1	1,1	2,2	2,2	2,2	3,3	
n...	0	0	0	1	0	1	1	2	2	0	1	0	2	
	2,1	2,1	2	1	1,5	1	1,3	1,7	0,9	2,6	1,1	1,8	1,9	1,6

Примечания. **К** – частный показатель реагирования;

К_ф – для фоновых интервалов;

К_{ст} – для стимульных интервалов

Таким образом, на каждом интервале

$K_{\phi} = N_{\phi}$ для данного интервала/ N ср.фона;

$K_{ст.} = N_{ст}$ для данного интервала/ N ср.фона.

Такой способ оценки более удобен потому, что вариабельность фоновой активности может замаскировать слабые реакции, а нормирование позволяет исключить зависимость оценок реакции от исходной фоновой активности рыб, меняющейся от опыта к опыту, от числа используемых рыб в эксперименте или от влияния предшествующего воздействия. Если поведение на стимульном интервале не отличается от такового на фоновом интервале, то суммарная оценка реакции (величина K_p) приближена к единице. Для более точной оценки реакций, особенно рыб, выращиваемых исключительно в лабораторных условиях, оценивается также их поведение в контрольном отсеке.

Частные показатели реагирования K суммируют по вертикали для всего массива данных по определенному виду раздражителя. В результате значение показателя реагирования K_p оказывается равным отношению среднего частных показателей реакции (стимул) к среднему частных показателей контроля (фон).

В данном случае

$$K_p = K_{ст}/K_{ф} = 1,6/1 = 1,6 \text{ (см. табл. 2).}$$

Достоверность отличий тестовой и контрольной оценок в экспериментах, оцениваемых по способу 2, определяют с помощью непараметрического критерия лямбда (λ) Колмогорова-Смирнова, по способу 1 – по критерию Стьюдента.

Использование методики оценки поведенческих реакций показало, что изменение поведения - часто наиболее отчетливый показатель неблагоприятных влияний на организм в отсутствии гибели рыб. Причем, наиболее уязвимыми могут оказаться «чувствительные» стадии раннего онтогенеза. Изложенная выше методика пригодна при выявлении степени неблагоприятного воздействия некоторых широко распространенных

токсикантов, например, обладающих нейротропным действием, на процессы «запечатления» химического стимула. Под влиянием неблагоприятных воздействий на рыб в ранний период онтогенеза может быть зарегистрировано изменение поведенческих реакций на стадии малька.

При изучении действия ксенобиотиков (например, пестицидов или нефтепродуктов) на процессы химической «памяти» осетровых рыб методика выдерживания личинок и анализа результатов поведенческих экспериментов аналогична вышеизложенной за исключением того, что подготовительный этап экспериментов (обработка токсикантами личинок в «чувствительный» для запечатления химических сигналов период) выполняют не в бассейнах, а в лабораторных условиях, в аквариумах.

В ихтиологических и физиологических исследованиях осетровых рыб, при изучении особенностей их нерестового хода и составлении прогнозов внимание обычно уделяется завершающему этапу, то есть наблюдению за зрелой частью популяции. С помощью методики, изложенной в данном разделе, удалось получить доказательства тому, что качественные изменения поведения, произошедшие в популяции осетровых рыб Азовского бассейна, могут быть связаны с антропогенным воздействием на самых ранних этапах личиночного развития рыб. В этот период осетровые обладают высокой пластичностью нервной системы (Бойко и др., 1993). Определенные поведенческие стереотипы у взрослых рыб, связанные с поведенческими ответами на химические сигналы и используемые при их ориентации, в раннем возрасте могут модифицироваться. При этом факторы среды (условия обитания молоди) и физиологические особенности (гормональный статус) влияют на способность к фиксации в памяти химических стимулов и изменяют временные параметры «чувствительного» периода (Бойко, 1996; Бойко, Корниенко, 2001; Бойко, Григорьян, 2002).

4. МЕТОДЫ УЧЕТА ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ

Данные методы позволяют проводить прямой учет частоты хромосомных нарушений, так как повреждения, вызванные мутагенами, отражаются в хромосомах. Таким образом, измерение хромосомных aberrаций является приемлемым параметром для мониторинга мутагенов.

4.1. Анафазный метод учета хромосомных aberrаций в клетках зародышей рыб

Оборудование и химическая посуда:

- холодильник для хранения зафиксированного материала;
- микроскоп с фотонасадкой;
- мерная посуда для приготовления растворов;
- обезжиренные предметные и покровные стекла;
- скальпель;
- пинцеты;
- препаровальные иглы;
- пробирки.

Реактивы:

- фиксатор Карнуа - абсолютный спирт, хлороформ и ледяная уксусная кислота в соотношении 6:3:1 или фиксатор Кларка - абсолютный спирт и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1;
- краситель – 2 г орсеина заливают 45 мл ледяной уксусной кислоты и нагревают до появления первых пузырьков, затем приливают 55 мл дистиллированной воды. После охлаждения добавляют 1Н HCl (на 9 частей краски 1 часть соляной кислоты). Перед употреблением краску фильтруют;
- спирт 96⁰, 70⁰;
- 45%-ная уксусная кислота.

Ход работы. Эмбрионов рыб на ранних стадиях развития фиксируют в фиксаторе Карнуа. Через один час фиксатор следует сменить, а через сутки промыть материал 96⁰ спиртом и перенести в 70⁰ спирт, хранить в холодильнике до последующего приготовления давленных временных ацетоорсеиновых препаратов хромосом.

Для приготовления препаратов используется введенный Свердсоном метод раздавливания эмбрионов рыб. После тщательной очистки от желтка зародыши окрашивают в течение суток ацетоорсеином. Окрашенный материал промывают в 45%-ной уксусной кислоте и переносят на предметное стекло в каплю такой же кислоты, покрывают покровным стеклом и легким нажатием на него в строго вертикальном направлении раздавливают до состояния окрашенного облачка. Сила нажима вырабатывается практически, для чего необходимо следить за степенью расположения клеток в один слой при помощи микроскопа. Анализ препаратов проводят под микроскопом с использованием иммерсионного объектива.

Критерии оценки препарата. При работе по анализу структурных мутаций хромосом клетки используют только препараты, отвечающие следующим требованиям: анализируются однослойные целые клетки с неразорванной оболочкой; хромосомы внутри клетки должны быть хорошо окрашенными, лежащими на фоне прозрачной цитоплазмы. При анализе учитываются анафазы и телофазы, в которых расстояние между группами хромосом больше ширины одной группы. Не рекомендуется исследовать телофазы, в которых начал образовываться фрагмопласт.

Оценка результатов. При регистрации хромосомных повреждений учитывают одиночные и групповые хромосомные и хроматидные мосты, парные и одиночные фрагменты, отставание хромосом, многополюсные митозы.

Аберрантные митозы подсчитывают как одиночные, независимо от того, приходилось ли на митоз множество aberrаций или одна.

Подсчитывают количество нормальных и аберрантных анафаз-телофаз и рассчитывают процент аберрантных клеток по формуле:

$$A : B \times 100 \%, \quad (7)$$

где А – количество клеток с нарушениями;
В – общее количество клеток.

Используемый метод позволяет проводить ежегодный экологический мониторинг загрязнения акваторий Азово-Донского бассейна. Выявлено, что пространственное распределение генотоксических загрязняющих веществ в воде, грунтах и тканях двустворчатых моллюсков неоднородно. Обнаружены загрязненные мутагенные районы, а это требует изучения причин и границ распространения с целью разработки и проведения ряда природоохранных мероприятий по предупреждению загрязнения. Отмеченные генотоксические эффекты негативно отражаются на жизнеспособности популяций рыб, вызывая патологии воспроизводства и миграций, морфологические уродства.

Начиная с 1988 г., ведутся наблюдения за частотой хромосомных нарушений на ранних стадиях развития у осетровых рыб, воспроизводимых на рыбоводных заводах Азовского бассейна. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Уровень естественного мутагенеза у предличинок русского осетра

Годы	Рогожинский ОРЗ	ОРЗ «Взморье»	Аксайско-Донской ОРЗ	Среднее по ОРЗ
1988	3,10 ± 0,64	—	—	—
1989	3,75 ± 0,37	—	—	—
1990	3,18 ± 0,87	—	—	—
1994	—	3,30 ± 1,13	—	—
1996	—	3,70 ± 0,87	—	—
1997	—	5,33 ± 0,75	4,32 ± 0,54	4,82 ± 0,43

1998	$2,89 \pm 0,24$	$1,45 \pm 0,27$	$3,30 \pm 0,77$	$2,55 \pm 0,29$
1999	$3,26 \pm 0,35$	$2,63 \pm 0,28$	$2,30 \pm 0,30$	$2,76 \pm 0,31$
2000	$,38 \pm 0,25$	$2,89 \pm 0,36$	$2,72 \pm 0,46$	$2,66 \pm 0,36$
2001	$3,812 \pm 0,30$	$3,87 \pm 0,40$	$2,16 \pm 0,37$	$3,56 \pm 0,38$

Можно отметить стабильность изучаемого процесса, так как частота хромосомных нарушений в общем невелика, колеблется в незначительных пределах и согласуется с литературными данными о фоновом природном мутировании рыб, что может быть показателем стабильности генетического состояния молоди осетровых в Азово-Донском районе.

5. МЕТОДЫ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕНЕТИКИ И КОМПЛЕКСНОГО МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Планирование рыбного промысла в современных условиях невозможно без учета подразделенной структуры популяций. Такой подход позволяет не только оптимизировать нагрузки на структурные компоненты промыслового вида и тем самым предотвратить нежелательные резкие колебания его численности, но и способствует сохранению биоразнообразия видов. Сохраняя даже относительно небольшие субпопуляционные группы, мы тем самым сохраняем адаптационный потенциал вида и возможность его успешной эксплуатации.

Популяционная генетика изучает процессы формирования генетического состава популяций и микроэволюционные преобразования видового уровня. Для достижения этих целей методология популяционной генетики тесно взаимодействует с систематикой, экологией, сравнительной морфологией и другими науками. Кроме того, популяционная генетика является наиболее формализованной биологической дисциплиной. Анализ данных здесь сопряжен с применением разнообразных статистических методов и специфических биометрических методов.

5.1. Метод биохимического полиморфизма

В последнее сорокалетие достигнут большой прогресс в исследованиях естественных и искусственных популяций с помощью применения методов биохимической генетики, оценивающих электрофоретическую подвижность белков. При этом важнейшим ее методологическим приобретением является фактическое соответствие гена, кодирующего конкретный белок, и его продукта, выявляемого электрофоретическими методами, то есть соответствие генотипа и фенотипа. Такая "близость" признака к гену

позволила развить математико-генетическую основу популяционной динамики, прояснить многие практические вопросы промысловой ихтиологии и получить биохимические маркеры для селекционной работы в рыбоводстве.

Приведем краткий пример использования метода биохимического полиморфизма для задач, связанных с исследованием структуры популяций промысловых рыб Азовского моря. Основой методической части является проведение электрофореза с целью выявления криптической изменчивости, генетическая интерпретация результатов электрофореза белков и их частный биометрический анализ. Дальнейший анализ выявляет различия изучаемых групп (субпопуляций) с учетом влияния основных факторов эволюционного процесса (мутации, миграции, генетический дрейф, естественный отбор), с оценкой стационарности распределений частот генов, применением метрик генетических расстояний и процедур многомерной статистики.

Электрофорез белков

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводят, используя прибор (Короленко, Дехта, 1981), который позволяет одновременно анализировать 50 образцов в гелевом блоке с размерами 300x75x2 мм.

Диск-электрофорез проводят в соответствии с общепринятыми методиками (Маурер, 1971) с небольшими модификациями. Для приготовления ПААГ используют растворы, представленные в таблице 4.

Растворы сополимеров готовят непосредственно перед использованием. Для приготовления разделяющего геля 20 мл соответствующего раствора сополимеров смешивали с 10 мл буферного раствора №1 или №2 и 30 мл 0,13%-го раствора персульфата аммония (ПСА). Конечный объем смеси составлял 60 мл. В качестве концентрирующего используют 4%-ный ПААГ, приготовленный на буферном растворе №3 в сочетании с буферным

раствором №1 разделяющего геля, или на буферном растворе №4 в сочетании с буферным раствором №2 разделяющего геля.

Таблица 4. Буферные растворы, применявшиеся в электрофорезе

Буферный раствор	1Н HCl, мл	Трис, г	ТЕМЕД, мл	Вода
Буферные растворы разделяющего геля				
№ 1, pH 8,9	48,0	36,6	0,23	До 100 мл
№ 2, pH 8,7	до pH 8,7	4,48	0,25	До 100 мл
Буферные растворы концентрирующего геля				
№ 3, pH 6,7	48,0	5,98	0,46	До 100 мл
№ 4, pH 6,7	до pH 6,7	0,726	0,6	До 100 мл

Примечания: Трис-оксиметиламинометан;
ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамид.

Растворы сополимеров разделяющего геля готовят, как указано в таблице 5.

Таблица 5. Состав растворов сополимеров разделяющего геля

Концентрация геля	10%	7,5%	5,5%
Акриламид	6,0 г	4,5 г	3,3 г
МБА	0,16 г	0,12 г	0,882 г
Вода	До 20 мл	до 20 мл	до 20 мл

Примечание: МБА – метиленбисакриламид.

Состав концентрирующего геля:

- акриламид - 0,48 г;
- МБА - 0,075 г;
- вода - 7,5 мл;
- буферный раствор №3 или №4 - 1,5 мл;
- 0,26%-ный раствор ПСА - 3,0 мл;
- конечный объем - 12 мл.

В качестве электродного используют Трис-глициновый буферный раствор pH 8,3 следующего состава: Трис – 0,4 г, глицин – 2,88 г, вода – до 1000 мл.

Условия электрофореза определяют созданием оптимального теплового режима. Для этого используют охлажденный до 4⁰ С электродный буферный

раствор. Плотность тока в начальном режиме составляет 4-5 мА/см². После прохождения полосы "свидетеля" бромфенолового синего через концентрирующий гель устанавливалась плотность тока 14-16 мА/см². Электрофорез останавливают по достижении фронтом "свидетеля" нижней кромки гелевого блока. Время разделения в зависимости от используемых буферных систем составляет от 45 до 120 минут. Буферные системы и гели, применявшиеся при электрофорезе ферментов и миогенов, приведены в таблице 6.

Таблица 6. Буферные системы и гели, применявшиеся при электрофорезе

Система	Ткань	Номер буфера разделяющего геля	Номер буфера концентрирующего геля	Концентрация разделяющего геля
Сывороточные белки	Сыворотка крови	1	3	7,5
Миогены	Мышцы	1	3	10
Эстеразы	Мышцы	2	4	10
Супероксиддисмутаза	Мышцы	2	4	7,5
Малатдегидрогеназа	Мышцы	2	4	7,5

Методы гистохимического окрашивания. По окончании электрофореза гелевый блок помещают в кювету со смесью реагентов для выявления разделенных зон белков. Применяют методы гистохимического окрашивания, широко используемые в генетике изоферментов (Корочкин и др., 1977) с небольшими модификациями.

Сывороточные белки и миогены выявляют окрашиванием в 1%-ном растворе амидового черного 10В в 7%-ной уксусной кислоте в течении 5-7 минут с последующей отмывкой блоков геля в 7%-ной уксусной кислоте.

Неспецифические эстеразы выявляют в инкубационной смеси, состоящей из 30 мг α-нафтилацетата, 50 мг прочного синего РР соли и 100 мл 0,05М Трис-НСl буферного раствора рН 7,1. α-Нафтилацетат и прочный

синий РР соль растворяют в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО). Инкубацию проводят в темноте при 37 °С до появления коричневой окраски зон деления.

Супероксиддисмутаза (СОД), (К.Ф.1.6.4.3.) выявляют в инкубационной смеси следующего состава: 100 мл 0,05М Трис-НСl буфера, рН 8,5, 20 мг тетранитротетразолиевого синего, 20 мг феназинметосульфата. Тетразолиевую соль предварительно растворяют в 1 мл диметилсульфоксида. Инкубируют гелевый блок при 37 °С около часа до появления интенсивного темного фона.

НАД-зависимую малатдегидрогеназу, (МДГ-НАД), (К.Ф.1.1.1.37.) выявляют в инкубационной среде следующего состава: 15 мл 0.5М Трис-НСl буфера рН 7,1, 50 мг НАД, 30 мг нитросинего тетразолиевого, 2 мг феназинметосульфата, 10 мл 1М L-малата натрия рН 7,0 и 70 мл воды (Shaw, Prasad, 1970). Гелевый блок инкубируют при 37 °С 1,5 часа.

Перечень электрофоретически анализируемых ферментов можно расширить с учетом возможностей имеющихся реактивов. Методы гистохимического выявления подробно описаны в многочисленных методиках (Луппа, 1980; Shaw, Prasad, 1970).

После проведения электрофоретического разделения биополимеров проводится генетическая интерпретация полученной картины полиморфизма. Данная процедура требует определенного опыта и заключается в идентификации мономорфных и полиморфных локусов. Последние интерпретируются по числу аллельных вариантов с проверкой распределения частот по уравнению Харди-Вайнберга.

Параметры аллозимной изменчивости и биометрические методы

Частота аллеля:

$$p_i = (n_{ii} + 0,5n_{ij}) / N, \quad (8)$$

где n_{ii} - число гомозигот по i -му аллелю;

n_{ij} - число гетерозигот по i -му аллелю;

N – объем выборки.

Наблюдаемая гетерозиготность по отдельному локусу:

$$H = N_H / N, \quad (9)$$

где N_H - число особей, гетерозиготных по данному локусу;

N - общее число изученных особей.

Ожидаемая из уравнения Харди-Вайнберга гетерозиготность по отдельному локусу:

$$H_{ож} = \sum_1^k x_j^2, \quad (10)$$

где x_j - частота j -го аллеля данного локуса;

k – число аллелей.

Значение средней гетерозиготности в популяции по исследованным локусам

$$H = 1/n \sum_1^n H_i, \quad (11)$$

где H_i - наблюдаемая гетерозиготность в i -том локусе;

n – число локусов.

$P_{0,95}$ – доля полиморфных локусов (%) при условии, что полиморфным считается локус, в котором частота аллеля не более 0,95. При расчете доли полиморфных локусов в число последних включали так называемые условно полиморфные, то есть такие локусы, которые несомненно полиморфны, но в силу недостаточной четкости разделения или перекрывания белковых спектров по этим локусам нельзя рассчитать частоты аллелей.

Дефицит гетерозигот:

$$D = H_{ож} - H, \quad (12)$$

где $H_{ож}$ и H - ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность.

Ошибка частоты генотипа (аллозимного фенотипа):

$$S_p = (pG_i(1 - pG_i) / n)^{1/2}, \quad (13)$$

где pG_i - частота генотипа;

n - величина выборки (Рокицкий, 1973).

Ошибка частоты аллеля:

$$S_{p_i} = (p_i(1 - p_i) / 2n)^{1/2}, \quad (14)$$

где p_i - частота аллеля;

n - величина выборки (Тихонов, 1967).

Стандартная ошибка средней гетерозиготности:

$$S_x = (\sum(x_i - x)^2 / m(m - 1))^{1/2}, \quad (15)$$

где x - средняя величина H ;

m - число локусов.

Индекс генетического подобия (ИГП) вычисляют по формуле Джеффриса-Матуситы, которая в модифицированном виде для расчета ИГП по n генотипам и L полиморфным локусам имеет вид:

$$ИГП = 1 - \sum \{ 1/2 \sum (pG_1^{1/2} - pG_2^{1/2})^2 \}^{1/2} / L, \quad (16)$$

где pG_1 и pG_2 - частоты аналогичных генотипов, соответственно, в первой и второй выборках.

Различия между выборками при значениях ИГП больше 0,92 являются недостоверными; при значениях от 0,85 до 0,92 – достоверными на 5%-ном уровне значимости; при значениях менее 0,85 – высокодостоверными. ИГП использовались для построения дендрограмм, формирование групп в которых производили взвешенным парно-групповым методом (Бейли, 1970).

Индексы генетического сходства и расстояния рассчитывают по М. Нею (Nei, 1972)

$$I = J_{xy} / (J_x * J_y)^{1/2}, \quad (17)$$

где J_{xy} , J_x и J_y — арифметические средние по всем локусам, соответственно;

$\sum x_i y_i$, $\sum x_i^2$ и $\sum y_i^2$, а x_i и y_i — частоты i -того аллеля в популяциях x и y соответственно;

$D = -\ln(I)$ — генетическое расстояние.

Достоверность различий в наблюдаемых частотах аллелей и генотипов оценивают по t -критерию.

Замечания к методу и результаты применения

Выше приведен далеко не полный перечень методов, применяющихся для анализа аллозимного полиморфизма. Более полные описания методов анализа с учетом конкретных популяционно-генетических задач можно найти в фундаментальных монографиях (Ли, 1978) и периодических научных изданиях.

Применение метода аллозимного полиморфизма позволило решить ряд задач практического свойства применительно к популяциям ценных промысловых видов Азовского моря. Так, многолетние исследования популяционной структуры осетровых рыб позволили показать стабильность генетического состава осетра на протяжении двадцати лет, выявить некоторое снижение гетерозиготности, связанное с его промышленным воспроизводством, рассчитать эффективную численность, успешно применять биохимические маркеры для работ по скрещиванию межродовых гибридов. Анализ биохимического полиморфизма позволил понять механизмы образования дефицита гетерозигот и учесть влияние инбридинга в естественных и искусственных поселениях мидии Азовского моря. Метод биохимического полиморфизма позволил выявить структурированность популяции тарани, что дало возможность учитывать ее подразделенность при планировании промысла. Применение метода позволило также определить ряд маркеров, связанных с хозяйственно важными признаками у рыб и моллюсков.

5.2. Комплексный морфометрический анализ

В процессе применения метода биохимического полиморфизма для изучения структуры популяций стала совершенно очевидной и слабая сторона этого методического подхода – близость исследуемых признаков к конкретному гену. Чем ближе к гену мы находимся в своих изысканиях, тем дальше удаляемся от системы генотипа, чье фенотипическое выражение и является объектом отбора. При этом даже максимально возможное увеличение числа отдельно изучаемых генов хотя и позволяет получить маркеры различного уровня интеграции популяций, но практически не дает возможности адекватно описать систему генотипа как целого.

Несомненный интерес в изучении природных популяций представляет генетически обусловленная изменчивость полигенных признаков, составляющих адаптивный комплекс организмов. Здесь недостаточно изучение отдельных признаков (генов), а требуется адекватное описание структуры фенотипа (генотипа). Биологические основы такого подхода к анализу внутривидовой изменчивости определены еще в работе И.И. Шмальгаузена (1938) "Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии".

Фенотип можно рассматривать как ансамбль взаимосвязанных структур и функций. Для описания его изменчивости достаточно измерить некоторую совокупность признаков, подвергнув его статистической обработке. Если с помощью корреляционного, кластерного или факторного анализов сгруппировать признаки, то в таком виде они будут выражать "систему онтогенетических корреляций организма" (Шмальгаузен, 1938), отражая особенности его индивидуального развития. Принцип функционально-системной организации состоит также и в том, что все признаки организма сгруппированы в конечное число функциональных систем. Как в генотипе

функционирующей единицей является ген, так в фенотипе функционально-приспособительной единицей выступает функциональная система; число последних не бесконечно и изменяется в процессе эволюции (Черепанов, 1986).

Поскольку фенотипические признаки организованы в системно-функциональные комплексы, развитие которых строго канализируется генотипом, то становится вполне очевидной возможность выделения групп организмов со сходно организованными фенотипическими структурами (= сходными генотипами) в популяции, то есть анализ ее генетической структуры. Широкие возможности для такого подхода предоставляет системный анализ, включающий многомерные статистические процедуры кластерного, факторного, дискриминантного и ряда других методов.

Существенной методической трудностью изучения морфогенетической структуры популяций является минимизация влияния постгенетической изменчивости, которая может мешать анализу генотипической структуры, маскируя ее особенности эпигенетическими корреляциями. В действительности фенотипические различия между организмами определяются, с одной стороны, их наследственными особенностями, с другой - экологическими факторами. Экологические условия не являются формообразующими факторами и влияют сходным образом на всю популяцию, а их фенотипические проявления зависят от генетических различий между организмами. Если в качестве морфологических признаков использовать их размерные характеристики, отнесенные к величине организма, то различия между относительной величиной признаков в популяции будут определяться в большей мере различиями в составе ее генотипов, поскольку влияние средовой компоненты на выражение признаков нивелируется процедурой их нормирования по размерам организмов, на которые существенным образом влияют экологические факторы и которые

таким образом будут учтены. Такой подход позволяет изучать структуру пропорций признаков и выделять группы организмов, характеризующихся сходством аллометрического роста в пределах нормы реакции, что, по сути, и является отражением генотипической структуры популяции.

Здесь мы приведем пример комплексного морфометрического анализа на основе исследования популяции пиленгаса и тарани в Азовском море.

Морфометрия

Измеряют 22 признака (табл. 7) по общепринятой методике (Правдин, 1966). Схема измерений приведена на рисунке 15. Все признаки преобразовывают в индексы, которые выражают величину каждого признака в долях единицы по отношению к длине рыбы (ab) или к длине головы (для головных признаков).

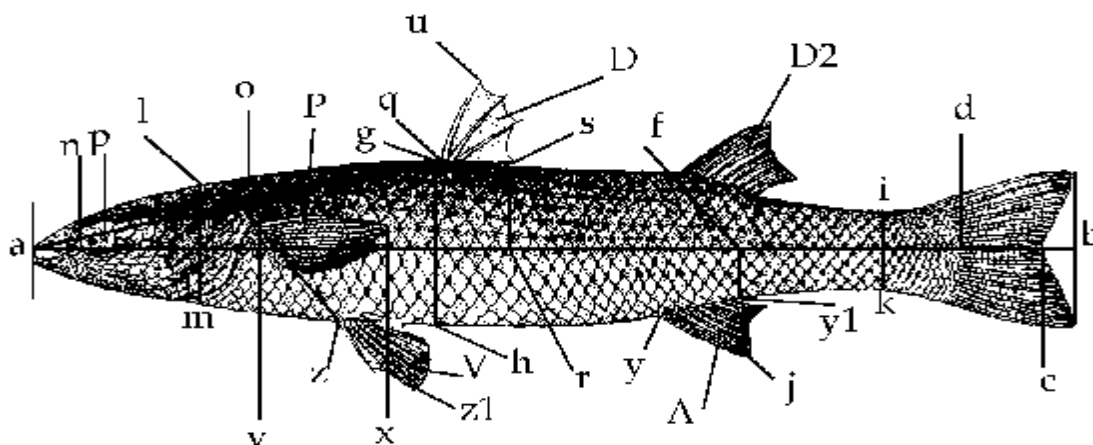


Рис. 15. Схема измерений (пиленгас)

Таблица 7. Обозначения измеряемых морфометрических признаков

1. ab - длина всей рыбы	12. aq - антедорсальное расстояние
2. ac - длина по Смигу	13. rd - постдорсальное расстояние
3. ad - длина без C	14. fd - длина хвост. стебля
4. od - длина туловища	15. qs - длина основания D
5. an - длина рыла	16. tu - наибольшая высота D

6. <i>np</i> - диаметр глаза	17. <i>уу₁</i> - длина основания <i>A</i>
7. <i>po</i> - заглазничный отдел	18. <i>у_j</i> - наибольшая высота <i>A</i>
8. <i>ao</i> - длина головы	19. <i>vx</i> - длина <i>P</i>
9. <i>lm</i> - высота головы у затылка	20. <i>zz₁</i> - длина <i>V</i>
10. <i>gh</i> - наибольшая высота тела	21. <i>vz</i> - расстояние между <i>P</i> и <i>V</i>
11. <i>ik</i> - наименьшая высота тела	22. <i>зу</i> - расстояние между <i>V</i> и <i>A</i>

Примечание. Основные обозначения плавников: *C* - хвостовой, *P* - грудной, *V* - брюшной, *A* - анальный, *D* и *D₂* - первый и второй спинные плавники.

Все признаки преобразуются в индексы, которые выражают величину каждого признака в долях единицы по отношению к длине рыбы (*ab*) или к длине головы (для головных признаков). При использовании комплексного морфометрического анализа для изучения структуры популяции мы неизбежно сталкиваемся с проблемой определения информативного комплекса признаков. Применяя статистические критерии для отбора признаков в каждой отдельной выборке, мы рискуем получить весьма различный их набор в силу качественных различий между изучаемыми выборками. Поэтому необходимо выделить информативный комплекс признаков во всей совокупности выборок с учетом их возможных различий. Он и послужит основой для дальнейшего анализа.

Эту задачу можно решить с помощью пошагового дискриминантного анализа выборок рыб, последовательно отбирая признаки с наибольшими значениями *F*-статистики и дискриминантных коэффициентов. Этот набор признаков и будет отражать морфогенетические особенности изучаемых групп рыб.

Дискриминантный анализ морфометрических индексов

При исследовании различий между классами выборок, а также для выбора информационного комплекса признаков используют дискриминантный анализ.

Основная его статистическая процедура состоит в вычислении канонических дискриминантных функций. Эта функция является линейной комбинацией дискриминантных переменных и имеет следующий вид:

$$f_{km} = u_0 + u_1 X_{1km} + u_2 X_{2km} + \dots + u_p X_{pkm}, \quad (18)$$

где f_{km} – значение канонической дискриминантной функции для m -го объекта в группе k ;

X_{ikm} – значение дискриминантной переменной X_i для m -го объекта в группе k ;

u_i – коэффициенты.

Коэффициенты первой функции выбираются таким образом, чтобы ее средние значения для различных классов максимально отличались. Коэффициенты второй функции выбираются так же, при этом ее значения не коррелируют со значениями первой функции. Максимальное число дискриминантных функций равно числу исследуемых классов без единицы (Ким, Мьюллер и др., 1989). Анализ двух классов дает одну дискриминантную функцию, трех классов – две и т.д. Статистические расчеты проводят с использованием программы Statistica.

Ниже (табл. 8) приведен пример статистических характеристик наиболее информативных индексов, полученных в результате анализа трех групп пиленгаса.

Статистика F-удаления оценивает значимость ухудшения различия групп после удаления индекса из списка. Толерантность равна единице минус квадрат множественной корреляции между индексом и всеми другими отобранными индексами и учитывает взаимную коррелированность индексов. Индексы с толерантностью, близкой к нулю, не дают новой информации. Критерий Ламбда-Уилкса учитывает как различия между группами, так и когезивность (плотность, компактность) каждой группы. Чем меньше значение критерия, тем более однородны и компактны группы и тем лучше

они различимы. Наиболее информативные признаки используются в дальнейшем анализе различий между изучаемыми субпопуляционными группами.

Таблица 8. Статистические характеристики наиболее значимых из 22 индексов, отобранных пошаговым дискриминантным анализом

Индексы	Ламбда Уилкса	Статистика F-удаления	Значимость	Толерантность
Po	0,178	31,66	<0,001	0,837
Ao	0,147	10,60	<0,001	0,618
Gh	0,162	20,81	<0,001	0,433
Ik	0,141	6,46	0,002	0,636
Fd	0,141	6,45	0,002	0,691
Tu	0,144	8,40	<0,001	0,721

Результаты дискриминантного анализа можно оценить по классификационной матрице и расстояниям между центроидами. Это даст информацию как о различиях между изучаемыми группами, так и по степени их взаимной трансгрессии.

Общие морфометрические различия между группами можно оценить, используя метрику расстояния Махаланобиса, которая является обобщенной мерой между группами по комплексу индексов. В таблице 9 приведен пример представления результатов расчета расстояния между тремя субпопуляциями по шести индексам.

Таблица 9. Морфометрические расстояния (квадрат расстояния Махаланобиса) между центроидами изучаемых субпопуляционных групп

	Азовское море	Керченский пролив	Ханское озеро
Азовское море		3,170	6,242
Керченский пролив	0,000		3,657
Ханское озеро	0,000	0,000	

Примечание. Выше главной диагонали приведены расстояния, ниже – вероятность нуль-гипотезы об отсутствии межгрупповых различий.

В таблице 10 приведен пример результатов классификации отдельных рыб по группам. Очевидно, что группы довольно хорошо различимы. Лучшие результаты классификации отмечаются для группы из Ханского озера (78%). В среднем 74% особей корректно классифицируются по принадлежности к своим группам.

Таблица 10. Классификационная матрица

Группы	Азовское море	Керченский пролив	Ханское озеро	Процент корректно классифицируемых особей
Азовское море	36	7	7	72
Керч. пролив	6	36	8	72
Ханское озеро	4	7	39	78
Суммарно	46	50	54	74

Структура средних и корреляций индексов в группах

Как уже отмечалось ранее, изучаются нормированные к длине рыбы признаки, то есть индексы. Тем самым нивелируется существенная часть влияния среды и различий в темпе роста. В сущности, индексы отображают аллометрические характеристики в пределах нормы реакции вида. Поэтому представляется важным сравнивать как средние их величины, так и корреляционную структуру в изучаемых группах пиленгаса. Более информативным показателем различий в характере индивидуального развития организмов в группах является корреляционная структура индексов, которая отражает тенденции аллометрического роста в пределах нормы реакции. Отображать корреляционную структуру в группах нагляднее в форме графов.

Замечания к методу и результаты применения

Вышеописанный пример применения комплексного морфометрического анализа не является исчерпывающим. Система промеров рыб может иметь свою специфику для различных видов. Для снижения влияния постгенетической изменчивости могут применяться различные системы индексов с учетом регрессионных зависимостей по каждому признаку. Поиск внутривидовых различий предполагает также применение методов факторного (метод главных компонент) и кластерного анализов в зависимости от степени различий индексов и структуры данных.

Применение метода комплексного морфометрического анализа показало его высокую эффективность для изучения структуры популяций ценных промысловых рыб. В частности, были получены методы выделения каспийской севрюги от азовской. Выявлены различия между ранней и поздней нерестовыми формами леща. Показана подразделенность и клинальная изменчивость четырех групп азовской тарани. Выявлена структурированность популяции пиленгаса в Азовском море и проведена оценка объемов его миграции в Черное море. Полученные результаты находят свое применение и учитываются при планировании промысла и искусственного выращивания этих рыб.

Глава 6. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИХТИООБЪЕКТОВ АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОГО БАССЕЙНА

Исследования физиологического состояния и генетической структуры популяций основных промысловых объектов Азовского, а затем и Черного морей начались в Азовском НИИ рыбного хозяйства в 1963 г., когда Людмила Васильевна Баденко сформировала специализированную лабораторию. В настоящее время они проводятся в основном сотрудниками отдела генетико-биохимического мониторинга, созданного в 1986 г. на базе двух лабораторий: «Физиология рыб» (руководитель к.б.н. Л.В. Баденко) и «Генетика и селекция рыб» (руководитель к.б.н. А.С. Чихачев).

С 1991 г. отделом руководит д.б.н. Галина Гавриловна Корниенко. В состав отдела входит сектор биохимии гидробионтов под руководством к.б.н. Сергея Ивановича Дудкина.

Качественное состояние популяций гидробионтов оценивается гистологическими, физиологическими, биохимическими, генетическими, ихтиологическими, рыбоводными и другими методами. У каждой обследуемой особи определяется по 30 и более показателей. Ежегодно сотрудники подразделения выпускают до 40 печатных работ. Материалы исследований вошли в монографические тематические издания (Житенева и др., 1989; 1997; 2001; 2003; Корниенко и др., 1998; Гребневик *Mnemioptosis...*, 2000; *Среда...*, 2001).

В лаборатории физиологии рыб развивались направления, преимущественно связанные с необходимостью совершенствования биотехники заводского воспроизводства осетровых. В этот период исследовалась физиолого-биохимическая изменчивость осетровых рыб в условиях зарегулированного стока рек с целью оценки их пригодности для промышленного воспроизводства. Выявлялись резервы повышения

эффективности использования производителей путем стимуляции созревания рыб различными гормональными препаратами. Изучалось влияние физиологического состояния самок белуги, осетра, севрюги на качество получаемой икры и жизнестойкость личинок и мальков. Были разработаны методы и определены критерии оценки жизнестойкости осетровой молоди, выращиваемой в разных условиях на рыбоводных заводах. Все разработки были внедрены в производственную практику на рыбоводных предприятиях Дона и Кубани и отмечены медалью ВДНХ (Баденко и др., 1984; Сборник..., 1986).

Исследования лаборатории физиологии постепенно расширялись и охватывали все больший круг вопросов. Одно из направлений исследований касалось изучения новых видов, используемых в прудовой аквакультуре, в частности большеротого буффало, кутума, пиленгаса при формировании маточных стад в различных экологических условиях. Разработаны и использовались в прудовом рыбоводстве диагностические тесты для отбора наиболее продуктивных производителей белого и пестрого толстолобиков, карпа (Дорошева и др., 1991). Даны физиологически обоснованные рекомендации по совершенствованию биотехники разведения рыбца и шемаи.

Другое направление исследований включало изучение эколого-физиологических аспектов, связанных с динамикой численности важнейших азовских промысловых рыб: осетровые, судак, лещ, тарань, рыбец. Например, в период зимовки 1976-1977 гг. в Азовском море произошла массовая гибель осетровых рыб. Сотрудники лаборатории вместе с ихтиологами участвовали в комплексных морских зимних экспедициях по выявлению ее причин. Были проведены прямые эксперименты по изучению метаболизма осетра в моделируемых условиях зимовки, в ходе которых установлены

биохимические закономерности влияния переохлажденной воды повышенной солености на зимующих рыб (Воловик и др., 1987).

В лаборатории генетики и селекции рыб разрабатывались селекционно-генетические аспекты совершенствования биотехники промышленного разведения гибридов осетровых – ценнейших объектов товарного рыбоводства. Были заложены физиолого-биохимические и генетические основы селекционной работы с межродовыми гибридами осетровых, изучены механизмы наследования признаков при отдаленной гибридизации видов с разным количеством хромосом. Установлено, что при межвидовом и внутривидовом скрещивании белки у осетровых наследуются кодоминантно, у гибридов происходит синтез белков обоих родителей, причем синтез собственных изозимов зародыша начинается со стадии гастрюляции. Разработан и прошел производственные испытания метод подбора оптимальных вариантов скрещивания производителей осетровых рыб при формировании маточного стада, заложены основы племенной работы с осетровыми рыбами. В работе использовались новые методы биохимической генетики и физиологического анализа. Результатом исследования стали биологические нормативы, позволившие оптимизировать получение посадочного материала для товарного выращивания гибридов осетровых. Предложена биотехника получения молоди гибридов осетровых с измененной ploидностью (Чихачев, 1987, 1991).

В 80-е годы сотрудники отдела занимаются важнейшей рыбоводной проблемой – научным обеспечением создающихся в Ростовской области селекционно-племенных хозяйств. На Донском зональном рыбопитомнике формируется племенное стадо карпа, дается генетическая характеристика производителей и пород, ведется селекционная работа. Масштабно обследуется фонд производителей карпа и толстолобика на рыбоводных хозяйствах области. На основе изучения биохимического полиморфизма

белков и наследования генетических маркеров, а также комплекса физиологических показателей у растительноядных рыб Бессергеновского рыбопитомника предлагаются селекционные мероприятия по формированию маточного стада элитных производителей.

В 90-е годы в отделе успешно развивается генетико-биохимическое направление рыбохозяйственных исследований. Например, детальные исследования сравнительной динамики нуклеиновых кислот в гонадах и соматических клетках осетровых, а также в процессе раннего онтогенеза подтвердили кариологические представления о дупликации генома и полиплоидном происхождении некоторых видов осетровых. Были обнаружены и подробно описаны полиморфные варианты гемоглобина, трансферринов и альбуминов сыворотки, белков мускулатуры и хрусталика, изозимов лактат- и малатдегидрогеназы у четырех видов осетровых бассейна Азовского моря, изучены некоторые характеристики этих белков. Установлено, что по уровню полиморфизма белков и гетерозиготности осетровые не уступают костистым рыбам и высшим позвоночным. В природных популяциях и модельных экспериментах обнаружена селективная значимость некоторых полиморфных вариантов белков при экстремальных условиях. Путем скрещиваний доказана генетическая природа отмеченного полиморфизма белков, что подтверждается и распределением их аллоформ в природных популяциях, соответствующим закономерностям популяционной генетики. У русского осетра описан тетрасомический тип наследования. Исследования белкового полиморфизма были успешно использованы для мониторинга структуры популяций осетровых рыб, обитающих в бассейне Азовского моря.

На основе выполненных исследований был создан компьютерный банк данных динамики изменения частот аллелей по ряду белковых локусов в 30 последовательных генерациях осетра и севрюги. Анализ рядов

последовательных генераций показал, что искусственное воспроизводство азовских осетровых существенно не изменило генетическую структуру их популяций. В этот период были разработаны некоторые теоретические основы системы мониторинга изменений структуры популяции осетровых рыб при комплексном антропогенном воздействии (Макаров и др., 1986). Исследованы проблемы формирования обонятельного импринтинга у молоди осетровых, обнаружена их очень высокая обонятельная чувствительность к химическим веществам. Объяснен механизм возникновения нарушений нерестовой миграции у азовских осетровых, связанный с особенностями организации их промышленного воспроизводства на рыбоводных заводах Кубани (Корниенко и др., 1988; Бойко, Чихачев, 1993; Бойко, 1996). Изучены биохимические и морфологические механизмы развития патологии мышечной ткани у каспийских и азовских осетровых.

Важным направлением работ отдела явились исследования в области марикультуры:

- изучены генетико-биохимические параметры дальневосточной кефали-пиленгаса при ее акклиматизации в Азово-Черноморский бассейн, черноморских кефалей сингиля и лобана, рекомендованных для пастбищного выращивания;

- проведены исследования генетической структуры поселений средиземноморской мидии в Азовском и Черном морях;

- исследовано влияние искусственных рифов на развитие азовских бычков.

На основе выполненных работ предложен комплекс методов биологического мониторинга объектов марикультуры в Азовском бассейне (Чихачев, 1991).

С 1987 г. в работах отдела широко развивается природоохранное направление, разрабатывается комплекс методов оценки генетической

безопасности в водоемах, апробируются различные тест-системы и тест-объекты для контроля мутагенности и генотоксичности среды обитания гидробионтов (Чихачев и др., 1996). Сотрудники отдела участвуют в создании низкотемпературного генетического банка промысловых и редких видов рыб. В ходе работ по сохранению биоразнообразия анализируется таксономический состав фауны гидробионтов бассейна Азовского и Черного морей, выявляются редкие и исчезающие виды. Эти материалы легли в основу национального доклада России по сохранению биоразнообразия в бассейне Черного моря. А.С. Чихачев и В.П. Закутский подготовили гидробиологический и ихтиологический разделы "Красной книги Ростовской области" (Редкие..., 1996). Сотрудники отдела внесли большой вклад в разработку теоретических основ сохранения генофонда осетровых рыб и методов физиолого-биохимического мониторинга популяций промысловых рыб – осетровых, тарани, леща, судака. Была изучена и описана географическая и временная подразделенность популяций этих видов, даны научные рекомендации по их рациональной эксплуатации и воспроизводству.

С 1991 г. исследования отдела сосредоточены на изучении экологических, физиологических, биохимических и популяционно-генетических закономерностей, определяющих формирование ихтиопродуктивности водных экосистем Азово-Черноморского бассейна в современных экологических условиях. Особое внимание уделяется изучению реакций популяций промысловых рыб и водных беспозвоночных на антропогенное загрязнение экотопов их обитания. Полученные материалы позволяют связать данные химико-токсикологического мониторинга бассейна с оптимизацией параметров промысловой эксплуатации имеющихся рыбных запасов.

В процессе проведения гистологических и биохимических исследований воспроизводительной системы разных видов рыб изучены

патологические нарушения, свидетельствующие о влиянии антропогенных факторов на разные этапы гаметогенеза, что позволяет обосновать прогноз репродуктивного состояния популяций рыб. На примере осетровых получена полная морфологическая картина особенностей дегенерации половых желез и значительных перестроек в обмене веществ в условиях нарушения миграционного поведения. Установлено, что резорбция трофических веществ икры наблюдается в течение 2-3 месяцев; скопления пигментов, как свидетельство прошедшей резорбции и неучастия рыб в воспроизводстве и нересте, сохраняются на ястыке более двух лет.

У самцов осетровых разрыхление, обильная гиперемия генеративной ткани, лизис половых клеток наблюдаются в течение 2-3 месяцев. По прошествии большого срока резорбированные семенники практически не отличаются от нормальных во II стадии зрелости. Это затрудняет диагностику прошедшей дегенерации и неучастия в нерестовой кампании самцов по пробам, собранным в море в другие сезоны года. Знание этапов резорбции яичников и семенников позволяет определить количество рыб, обитающих в море, пропустивших нерест в текущем, а для самок – и в предыдущем году. Глубина изменений гонад свидетельствует о том, что адаптивно обусловленный процесс резорбции, при отсутствии условий для нереста, не безвреден для физиологического состояния рыб и их повторного созревания.

Ежегодный мониторинг функционального состояния репродуктивной системы позволил выявить различные типы нарушений процессов развития гонад разных видов рыб как следствие неблагоприятного воздействия окружающей среды. Так, у осетровых отмечены

- задержка в развитии гонад на I-II стадии зрелости в возрасте 9-13 лет у 7% самок осетра;

- развитие кист и выростов на генеративной ткани у 1-3% взрослых самок;
- необратимое жировое перерождение яичников в 16-20 лет;
- гермафродитизм у 4% половозрелой популяции осетра;
- асинхронность развития ооцитов на ястыке.

Большинство патологий состояния гонад, выявленных у осетровых в море, - прямое доказательство генотоксичного влияния среды обитания на развитие аномалий (Корниенко и др., 1998).

У самцов осетровых морфологические и функциональные изменения характеризуются гиперемией, кистообразным и жировым перерождением гонад.

В 1992-1996 гг. (период значительного антропогенного пресса) в море после окончания нерестового периода наблюдали значительное (в среднем 30% от нерестовой популяции) число осетров, резорбирующих половые клетки (Корниенко и др., 1998).

Таким образом, гистологические исследования гонад подтверждают неучастие в завершении нерестовой миграции и процессе воспроизводства 20-40% производителей осетра, что значительно снижало возможный объем промысловых уловов и пополнение популяций молодь. Использование гистологических и биохимических методов исследования других органов и тканей позволяют наблюдать картину морфо-функциональных нарушений у части популяций разного вида рыб Азово-Черноморского бассейна, свидетельствующих о неблагоприятной экологической обстановке в разные периоды жизни. Это вселяет научно обоснованную тревогу за сохранность некоторых видов гидробионтов.

Многолетние морфо-функциональные исследования гистологической структуры тканей, органов, систем органов осетровых, судака, леща, тарани, пиленгаса показали, что многие из них имели значительные патологические

изменения в репродуктивном комплексе, структуре жабр, почек, печени, крови - гиперплазию многослойного и дыхательного эпителия в сочетании с деформацией ламелл и филаментов жабр, локальный гломерулонефрит туловищных почек, мышцы с признаками дистрофических изменений (судак), жировую и гидropическую дистрофию печени, отсутствие границ между красной и белой пульпой в селезенке, дегенерацию отдельных половых клеток, патологию клеток крови.

Патоморфологические нарушения приводят к изменениям процента репродуктивно полноценных рыб и темпа созревания, снижению плодовитости, нарушению обмена веществ. Знание морфологических нарушений позволяет прогнозировать репродуктивный потенциал популяций рыб.

В отделе разработаны и находятся в стадии разработки методы экотоксикологической оценки качества среды обитания гидробионтов. Ежегодно проводится биохимический мониторинг основных промысловых рыб - оценивается негативное влияние антропогенного загрязнения водной экосистемы на их биопродуктивные качества. Так, условия обитания и нагула осетровых рыб в Азовском море в 1997-2003 гг., в отличие от 1990-1996 гг., были благоприятнее для репродукции рыб. Например, у осетровых в течение всех сезонов 2001 г. значения активности детоксикационных систем (микросомальные монооксигеназы печени) составляли по содержанию цитохрома P-450 не более 5 нМ/мг белка микросом, в то время как в предшествующий период его количество при созревании возрастало у самок в 2,5-3, а у самцов - в 3,5-5 раз, что подтверждается данными химико-аналитического определения поллютантов в тканях рыб (Дудкин, 2001).

Из всех видов рыб, исследованных по биохимическим показателям (осетровые, судак, камбала-калкан, чехонь, лещ, тарань, рыбец, шемая, сингиль, карп, белый и пестрый толстолобики), пиленгас демонстрирует

наибольшую устойчивость и высокую стабильность этих показателей в условиях обитания в Азовском море. Одновременно у пиленгаса отмечается стабильность репродуктивной функции. В основе этой стабильности лежат биохимические особенности, в частности высокая обеспеченность организма биологическими антиоксидантами при «спокойном» состоянии детоксикационных систем печени (Дудкин, 2001).

Используемая система методов позволяет выявлять разноуровневые эффекты действия загрязняющих веществ не только в местах локального обитания, но и вести долговременный мониторинг в целом по бассейну. Это дает возможность наблюдать тенденции изменения продуктивности водоемов при меняющихся уровнях загрязнения и, при необходимости, вносить соответствующие поправки в режим промыслового изъятия. Учет этих тенденций необходим и для создания долгосрочных программ развития рыбной отрасли на бассейне. Необходимо подчеркнуть, что все исследования выполняются в естественных популяциях рыб и выводы не являются результатом аппроксимации аквариальных токсикологических опытов на естественные водоемы.

Для изучения экотоксикологической обстановки Нижнего Дона, Таганрогского залива, некоторых прибрежных районов Азовского и Черного морей использованы методы оценки генотоксичности среды обитания, основанные на анализе воды, грунтов и тканей малоподвижных морских и пресноводных гидробионтов (Корниенко и др., 2001).

Применение методов комплексного морфометрического анализа показало его высокую эффективность для изучения структуры популяций ценных промысловых рыб. В частности, с их помощью были определены результаты интродукции каспийской севрюги в Азовское море, были выявлены различия между ранней и поздней нерестовыми формами леща. Этими методами, а также исследованиями белкового полиморфизма показана

подразделенность и клинальная изменчивость четырех групп азовской тарани. Выявлены элементы формирования популяционно-генетической структуры у пиленгаса в Азовском море, возникающей в результате адаптации вида в новом ареале обитания, и проанализирована его миграция в Черное море. Полученные результаты по изучению популяционной генетики азовских рыб учитываются при планировании их промысла и промышленного выращивания.

Важное направление работ отдела связано с изучением механизмов формирования адаптивных способностей молоди осетровых, к которым относится и закладка особенностей миграционного поведения зрелых рыб. Показаны роль тиреоидных гормонов и кортизола в процессах, определяющих выживаемость молоди осетровых рыб при их выращивании, явление обонятельного импринтинга и формирование хоминга этих рыб (Бойко, 2002). Охарактеризовано влияние нарушений эндокринной системы и обмена половых стероидных гормонов на особенности миграционного поведения осетровых рыб и судака (Сергеева, 2001; Ложичевская и др., 2001).

Появление в Черном и Азовском морях нового желтелого вселенца гребневика *Mnemiopsis leidyi* отрицательно сказалось на продуктивности рыбных сообществ бассейна. В последующем в Черное море был занесен и другой гребневик *Beroe ovata* - специализированный хищник мнemiопсиса и плевробрахии. В отделе были развернуты исследования по изучению метаболических особенностей гребневиков (дыхание, экскреция азота, солевая толерантность), их физиологических функций, связанных с процессами роста, питания, размножения, адаптивных реакций на изменение кислородного и температурного режимов, солености, условий голодания. Выполненные работы позволили понять трансформирующее влияние ежегодного развития популяции мнemiопсиса в Азовском море на продукционно-деструкционные процессы и рыбные сообщества.

Исследование физиологических и метаболических свойств берое показало его высокую эффективность для подавления локальных популяций мнемипсиса в водных экотопах с соленостью не ниже 9‰. В диапазоне солености 4,5-9‰, характерном для ряда прибрежных водоемов Азовского моря и благоприятном для развития популяций мнемипсиса, берое не может оказывать такого сдерживающего воздействия (Дудкин и др., 2001 а, б).

В последние годы основные работы отдела связаны с мониторингом состояния популяций основных промысловых рыб, позволяющим определить трофическую обеспеченность популяций промысловых рыб, связанную с темпом роста, периодичностью и темпом созревания, влияние токсобных факторов в биотопе обитания на популяции видов по метаболическим изменениям в органах жизнеобеспечения и репродукции, патоморфологии клеток крови. Результаты анализа трофической составляющей условий обитания и нагула популяций основных промысловых видов на современном уровне их численности показывают, что в целом они адекватно обеспечены пищевыми ресурсами. В последние годы (1998-2003) отмечена тенденция снижения негативного влияния антропогенного загрязнения на промысловые объекты по сравнению с 1980-1997 гг. Основными факторами снижения рыбопродуктивности Азовского моря остаются чрезмерное браконьерское изъятие и подрыв фонда производителей, низкое воспроизводство и незначительное пополнение моря молодью рыб, негативное влияние гребневика-мнемипсиса и загрязнения водной среды. Наметившиеся тенденции увеличения производства промышленной и сельскохозяйственной продукции, включение России в международную кооперацию в качестве поставщика сырьевых ресурсов, связанная с этим активизация транспортных потоков и перспективы нефтегазового освоения месторождений Азово-Черноморья создают предпосылки к увеличению пресса антропогенного загрязнения на биоресурсный потенциал бассейна. Поэтому система

управления антропогенным вмешательством должна оставаться достаточно оперативной и гибкой, направленной на долговременное сохранение биоресурсного потенциала и биологического разнообразия в бассейне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование комплекса разноплановых методик для исследований функционального состояния и репродуктивного потенциала рыб в постоянно изменяющихся условиях среды обитания показало, что, несмотря на промышленный спад в бассейне Азовского моря, повлекший за собой некоторое снижение загрязнения водоемов, стабилизации показателей функционального состояния не наблюдается. Масштабы негативных изменений у рыб держатся на высоком уровне 1992-1993 годов. В настоящее время есть все основания связывать нарушения в поведении рыб с загрязнением среды их обитания. Даже кратковременного воздействия токсикантов в дозах, не приводящего к гибели рыб, достаточно для нарушения их ориентации и изменения гормонального обмена в организме, приводящего к снижению воспроизводства. Это весьма важно для разработки кратко- и долгосрочных прогнозов состояния промысловых запасов и определения допустимого вылова. Данные применения методик популяционно-генетических исследований подтверждают необходимость при учете запасов и разработке прогнозов уловов учитывать структурированность популяций и изменчивость миграционного поведения основных промысловых объектов.

Таким образом, разноплановые биохимические, физиологические, гистологические, генетические исследования безусловно необходимы для изучения состояния популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Арчаков А.И., Девичинский В.М., Карудина И.М.** и др. Влияние концентрации буфера на скорость реакции транспорта электронов в микросомах печени// Биохимия. 1968. Т.33. № 3. С. 479 - 488.
2. **Баденко Л.В., Дорошева Н.Г., Корниенко Г.Г., Чихачева В.П.** Эколого-физиологические основы повышения эффективности заводского разведения азовских осетровых// Воспроизводство рыбных запасов Каспийского и Азовского морей. М., 1984. С.88-101.
3. **Бейли Н.** Математика в биологии и медицине. М.: Мир, 1970. 326 с.
4. **Биохимические методы исследования в клинике/** Под ред. проф. А.А.Покровского. М., 1969. С. 62-63.
5. **Бойко Н.Е., Григорьян Р.А., Чихачев А.С.** Обонятельный импринтинг молоди осетра// Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1993. Т. 29. № 5-6.
6. **Бойко Н.Е.** Обонятельный импринтинг и влияние антропогенных факторов на поведение молоди осетра// Основн. пробл. рыбного хоз-ва и охраны рыбохоз. водоемов Азовского бассейна: Сб. научн. тр. АзНИИРХа. Ростов-на-Дону: Полиграф, 1996. С. 278-290.
7. **Бойко Н.Е., Григорьян Р.А.** Влияние тиреоидных гормонов на запечатление химических сигналов в раннем онтогенезе осетра *Acipenser güldenstadti*// Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2002. Т. 38. №2.
8. **Бойко Н.Е., Корниенко Г.Г.** Факторы пластичности в раннем онтогенезе осетра *Acipenser güldenstadti* // Экологические проблемы Кубани. 2001. С. 146-150.

9. Бойко Н.Е., Чихачев А.С. Обонятельный импринтинг молоди осетровых// Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1993. Т. 29. С. 516-521.

10. Виноградова В.М., Мантейфель Ю.Б. Запоминание химических раздражителей молодью гуппи *Poecilia reticulata* Peters (Poeciliidae)// Вопросы ихтиологии. 1984. Т.24. С.836-842.

11. Воловик С.П. и др. Генеральная схема управляемого осетрового хозяйства на Азовском бассейне и обоснование мероприятий, обеспечивающих реализацию биопродуктивного потенциала моря. Ростов-на-Дону: АзНИИРХ, 1987. 68 с.

12. Глаголева Т.П. Инструкция по гематологическому контролю за искусственно выращиваемой молодью лососевых рыб. Рига, 1981. 38 с.

13. Гребневик Mnemiopsis leidyi (A. Agassiz) в Азовском и Черном морях: биология и последствия вселения / Под науч. ред. д.б.н., проф. С.П. Воловика. Ростов-на-Дону: БКИ, 2000. 500 с.

14. Девицина Г.В. Морфология первичных проекций хемосенсорных систем и некоторые аспекты их взаимодействия в мозге осетровых рыб (*Acipenseridae*) //Вопросы ихтиологии. 2000. Т.40. №1. С. 64-74.

15. Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И. Развитие осетровых рыб. М., 1981.

16. Дингл Дж. Лизосомы. Методы исследований. М.: Изд-во «Мир», 1980. С. 137-140.

17. Дорошева Н.Г., Корниенко Г.Г., Ружинская Л.П., Рудницкая О.А., Ковальчук Л.И. Влияние функционального состояния на результаты искусственного воспроизводства азовского осетра в современный период // Биол. основы индустриального осетроводства: Тр. ВНИРО. М., 1991. С. 182-212.

18. Дубинина Л.Т. Структурные мутации в опытах с *Crepis capilaris*. М., 1978. С. 161-162.

19. Дудкин С.И. Биоантиоксиданты гидробионтов в мониторинге биогенного и техногенного загрязнения морских акваторий// Пробл. сохр. экосистем и рац. использ. биоресурсов Азово-Черноморского бассейна: Тез. докл. Международн. конф. 8-12 окт. 2001 г. Ростов-на-Дону, 2001. С. 68-69.

20. Дудкин С.И. Изменения активности микросомальных монооксигеназ и жирорастворимых витаминов в печени при созревании и анадромной миграции азовского осетра// Экологич. и морфо-функциональн. основы адаптации гидробионтов: Тез. докл. симп., посвященного 100-летию проф. Н.Л. Гербильского. СПб, 2000а. С. 61.

21. Дудкин С.И. Роль биологических и синтетических антиоксидантов в адаптивной пластичности молоди осетра// Экологич. и морфо-функциональн. основы адаптации гидробионтов: Тез. докл. симп., посвященного 100-летию проф. Н.Л. Гербильского. СПб, 2000б. С. 60.

22. Дудкин С.И. Свободнорадикальные процессы и биоантиоксиданты гидробионтов в мониторинге биогенного и техногенного загрязнения морских акваторий// Проблемы гидроэкологии на рубеже веков: Тез. междунар. конф., 23-30 окт. 2000 г. СПб, 2000в. С. 52-53.

23. Дудкин С.И. Экологическая физиология и биохимия Азово-Черноморских гидробионтов и проблемы рыбного хозяйства Краснодарского края// Экологические проблемы Кубани: Сб. трудов КГАУ. № 12. Краснодар, 2001. С. 189-194.

24. Дудкин С.И. Система биомониторинга состояния популяций рыб в связи с оценкой влияния антропогенного загрязнения Азовского моря// Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах: Тез. докл. Международн. конф. Москва, МГУ, 27-29 мая 2002 г. М., 2002. С.105.

25. Дудкин С.И., Зиновьев Н.А., Жиликова Л.Ю., Рудницкая О.А., Ложичевская Т.В. Экспертная система оценки физиологического осетровых рыб// Основн. пробл. рыбного хозяйства и охраны рыбохоз. водоемов Азово-

Черноморского бассейна: Сб. научн. тр. АзНИИРХа. Ростов-на-Дону, 1998. С. 407- 412.

26. Дудкин С.И., Зиновьев Н.А., Рудницкая О.А., Ложичевская Т.В. Моделирование изменений нерестового поведения азовских осетровых с помощью экспертной системы оценки их физиологического состояния//Мат. XI Всерос. конф. по промысл. океанологии. Калининград, 14-18 сент. 1999 г. М.: Изд-во. ВНИРО, 1999. С. 144-145.

27. Дудкин С.И., Колесникова Л.В., Сапожников В.М. Оценка влияния антропогенного загрязнения на репродуктивные качества осетровых рыб Азовского моря в современный период// Тез. докл. Междунар. конф., посвященной 70-летию Калининградского ГТУ, ч. 1. Калининград, 17-19 окт. 2000. Калининград: Изд-во КГТУ, 2000. С. 7-9.

28. Дудкин С.И., Колесникова Л.В., Цема Н.И., Цыбульская М.А., Искра Е.В. Токсикологический и биохимический мониторинг популяций рыб Азовского моря// Современные проблемы водной токсикологии: Тез. докл. Всеросс. конф. Борок, 19-21 ноября 2002 г.

29. Дудкин С.И., Колесникова Л.В., Колмакова Т.С. Оценка негативного действия антропогенного загрязнения на репродуктивную функцию азовского осетра// Тез. докл. I конгресса. ихтиологов. Астрахань, 1997. С. 217.

30. Дудкин С.И., Корниенко Г.Г., Мирзоян З.А. Исследование гребневика *Вегое ovata* в условиях пониженной солености в связи с прогнозом развития его популяции в азовском ареале// Тез. докл. VIII съезда Гидробиол. общества РАН. Калининград, 2001. С.76-77.

31. Дудкин С.И., Корниенко Г.Г., Сапожников В.М., Колесникова Л.В. Биохимический мониторинг антропогенного загрязнения и репродуктивные качества азовских осетровых рыб в современный период//

Осетровые на рубеже XXI века: Тез. докл. Междунар. конф, Астрахань 11-15 сент. 2000. Астрахань: Изд-во КаспНИРХ, 2000. С. 141-142.

32. Дудкин С.И., Ложичевская Т.В., Мирзоян З.А. Метаболизм гребневика *Mnemiopsis leidyi* в азовском ареале и некоторые экологические последствия его вселения// Тез. докл. VIII съезда Гидробиол. общества РАН. Калининград, 2001. С. 75-76.

33. Елисеев В.Г. Гистологическая техника. М.: Медгиз, 1954. 164 с.

34. Елисеев В.Г. Основы общей гистологии и гистологическая техника. М.: Медгиз, 1959. 214 с.

35. Житенева Л.Д. Экологические закономерности ихтиогематологии. Ростов-на-Дону: АзНИИРХ, 1999. 56 с.

36. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Тромбоциты рыб и других позвоночных. Ростов-на-Дону: Эверест, 2003. 72 с.

37. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Эволюция крови. Ростов-на-Дону, 2001. 113 с.

38. Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов-на-Дону: Ростиздат, 1989. 112 с.

39. Житенева Л.Д., Рудницкая О.А., Калюжная Т.И. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб/ Справочник. Ростов-на-Дону: Изд. «Молот», 1997. 152 с.

40. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. Сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб. М., 1983. 110 с.

41. Инструкция к набору реактивов для определения общего холестерина в сыворотке крови по методу Илька. Разраб. центр. институтом усоверш. врачей. М., 1968. 4 с.

42. Инструкция по физиолого-биохимическим анализам рыб. М., 1986. 52 с.

43. Касумян А.О., Пономарев В.Е. Исследование поведения данио рерио *Brachiodanio rerio* Hamilton Buchanan (Ciprinifonnes, Ciprinidae) при действии естественных химических стимулов// Вопросы ихтиологии. 1986. Т. 26. С. 665-673.

44. Ким Дж.-О., Мьюллер Ч.У., Клекка У.Р., Олдендерфер Р.К., Блэшфилд Р.К. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. М.: Финансы и статистика, 1989. 215 с.

45. Козинец Г.И., Макаров В.А. Исследования системы крови в клинической практике. М.: Триада–Х, 1997. 480 с.

46. Корниенко Г.Г., Ложичевская Т.В., Реков Ю.И. Половое созревание азовского осетра// Рыбн. хоз-во. 1988. №3. С. 93-95.

47. Корниенко Г.Г., Дехта В.А., Кузина В.Ф., Шишкина И.В. Эколого-генетический мониторинг загрязнения акватория Азово-Донского бассейна// Геоэкономические исследования и охрана недр/ Инф. сб. М: ЗАО «Геоинформмарк», 2001. Вып. 4. С. 3-9.

48. Корниенко Г.Г., Дудкин С.И., Ложичевская Т.В. Оценка функционального состояния азовского осетра в современных условиях// Материалы I (IX) Междунар. совещ. по эволюц. физиологии. СПб., 1996. С. 108.

49. Корниенко Г.Г., Кожин А.А., Воловик С.П., Макаров Э.В. Экологические аспекты биологии репродукции. Ростов-на-Дону: Изд-во «Эверест», 1998. 238 с.

50. Короленко П.И., Дехта В.А. Усовершенствованный прибор для вертикального электрофореза// Гидрохимические материалы. Л.: Гидрометеиздат. 1981. Т.82. С. 87-89.

51. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.

52. Кривобок М.Н., Тарковская О.И. Определение жира в теле рыб/ Руководство по методике исследований физиологии рыб. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 6.

53. Кулаев С.И. Годовой цикл и шкала зрелости семенников половозрелой плотвы// Записки Большевской биол. станции. 1927. Вып. 11.

54. Кулаев С.И. Строение и цикл развития семенников половозрелого сома // Зоологич. журн.. 1944. Т. 23. Вып. 6. С. 330-340.

55. Левицкий А.П., Барабаш Р.Д., Коновец В.М. Сезонные особенности активности рибонуклеазы и α -амилазы слюны и слюнных желез у крыс линии Вистар // Биохимическая эволюция. М., 1973. С. 192-195.

56. Ли.Ч. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978. 555 с.

57. Ложичевская Т.В., Рудницкая О.А., Дорошева Н.Г., Ружинская Л.П. Оценка функционального состояния осетровых рыб в изменяющихся экологических условиях Азово-Кубанского побережья// Сб. трудов «Экологические проблемы Кубани». Краснодар: КГАУ, 2001. №12. С. 205-209.

58. Луппа Х. Основы гистохимии. М.: Мир, 1980. 343 с.

59. Макаров Э.В., Реков Ю.И., Цветненко Ю.Б., Чихачев А.С. Участие производителей заводского происхождения в формировании нерестовой популяции русского осетра// Рыбное хоз-во. 1986. №9. С. 34-36.

60. Марти Ю.Ю. Миграции морских рыб. М: Пищевая промышленность, 1980. 247 с.

61. Маурер Г. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971. 247 с.

62. Павлов Д.С., Нечаев И.В., Лупандин А.И., Костин В.В., Нездолий В.К., Глухова Е.В., Садковский Р.В. Гормональные механизмы покатной миграции личинок плотвы *Rutilus rutilus*// Вопросы ихтиологии. 1998. Т. 38. №2. С. 257-266.

- 63. Паушева З.П.** Практикум по цитологии растений. М.,1980. С.114-145.
- 64. Пирс Э.** Гистохимия. М.: Изд. иностр. лит-ры, 1962. 929 с.
- 65. Покровский А.А., Арчаков А.И.** Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций// Современные методы в биохимии. М., 1968. С. 5-59.
- 66. Правдин Н.Ф.** Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-сть., 1966. 376 с.
- 67. Проблемы** репродуктивной биологии в трудах профессора С.И. Кулаева и его последователей. М.: МГУ, 1998. 349 с.
- 68. Пушкина Н.Н.** Биохимические методы исследования. М.: Медгиз, 1963. 63 с.
- 69. Редкие** и исчезающие животные Ростовской области. Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1996. 444 с.
- 70. Рокицкий П.Ф.** Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1973. 320 с.
- 71. Роскин Г.И.** Микроскопическая техника. М.: Изд-во «Советская Наука», 1951. 447 с.
- 72. Руководство** по методике исследований физиологии рыб. М.: Из-во АН СССР, 1962. 142 с.
- 73. Сакун О.Ф., Буцкая Н.А.** Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб// Рыбное хоз-во. 1963.
- 74. Сборник** инструкций и нормативно-методических указаний по промышленному разведению осетровых рыб в Каспийском и Азовском бассейнах. М.: Изд-во ВНИРО, 1986. 272 с.
- 75. Сергеева С.Г.** Эколого-биохимические параметры состояния производителей судака в Азово-Кубанском районе// Экологические проблемы Кубани: Сб. трудов, КГАУ № 12. Краснодар, 2001. С. 209-214.

76. Солуха Б.В. Методы измерения чувствительности, ориентированных перемещений и специализированных актов рыб в полях химических раздражителей// Хемочувствительность и хемокоммуникация рыб. М.: Наука: АН СССР, 1989. С. 5-96.

77. Среда, биота и моделирование экологических процессов в Азовском море/ Коллектив авторов. Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2001. 413 с.

78. Строев Е.А., Макарова Е.Г. Практикум по биологической химии. М., 1986. С. 190.

79. Трансграничное загрязнение// Тез. докл. 4-й Междунар. конф. Балканской ассоциации по окружающей среде. 18-21 сент. 2001 г. Эдирне, Турция. 2001. С. 142.

80. Тихонов В.Н. Использование групп крови при селекции животных. М.: Колос, 1967. 392 с.

81. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. М.: Медицина и физкультура, 1961. С. 601-602.

82. Трусов В.З. Некоторые особенности созревания и шкала зрелости половых желез осетра// Тр. ВНИРО. 1964. Т. 56. Вып. 3. С. 69-78.

83. Турдаков А.Ф. Воспроизводительная система самцов рыб. Фрунзе: Изд-во «Илим», 1972. 245 с.

84. Черепанов В. В. Эволюционная изменчивость водных и наземных животных. Новосибирск: Наука, 1986. 387 с.

85. Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. М.: Изд-во АН СССР, 1959. 474 с.

86. Чихачев А.С. Использование генетических методов для решения рыбохозяйственных проблем Азовского бассейна// Современное состояние и перспективы использования и охраны рыбного хозяйства в бассейне Азовского моря: Тр. ВНИРО. Ч. 2. Аквакультура. 1987. С. 117-119.

87. Чихачев А.С. Основы физиолого-биохимического и генетического мониторинга объектов марикультуры// Рыбное хозяйство. 1991. №12. С. 57-59.

88. Чихачев А.С., Кузина В.Ф., Шишкина И.В., Ковальчук Л.И. Мутагенное действие поллютантов на генетический аппарат осетровых// Основн. пробл. рыбн. хоз-ва и охраны рыбохоз. водоемов Азовского бассейна: Сб. научн. тр. АЗНИИРХа. Ростов-на-Дону: Полиграф, 1996. С. 272-278.

89. Шмальгаузен И.И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.- Л., 1938. 223 с.

90. Dudkin S.I Kornienko G.G., Kolesnikova L.V., Tsybulskaya M.A. Biomonitoring of long-term consequences of the antropogenic pollution of the Azov sea by reproductive properties of sturgeons / XI Int. Symp. On Bioindicators «Probl. of today in Boiindication and Biomonitoring» 17-21 sept. 2001.Syktyvkar, 2001. P. 390-391.

91. Dudkin S.I., Kornienko G.G., Lodzhichevskaya T.V. Monitoring of reproductive potential of Azov sea sturgeon/ III Intern. Sympos. of Sturgeon.Rome. 1997. P. 187.

92. Dudkin S.I., Kornienko G.G., Lozhichevskaya T.V. Reproductive potential of Azov sea sturgeon under present habitat conditions/ J. Appl. Ichthyol.- 1999.V. 15(4-5). P. 290-291.

93. Hasler A.D., Scholz A.T. Olfactory imprinting and homing in salmon // Zoophysiology. Springer Verlag (London). 1983. P. 1-30.

94. Nei M. Genetic distance between populations //Amer. Natur. 1972. V. 106. P. 283-292.

95. Omura A.T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes // Solubilization, purification and properties. J.Biol. Chem. 1964. V. 239. № 7. P. 2379-2385.

- 96. Pappenheim A., Virchows Arch.** 1899.157, p.19. (по Пирсу, 1962)
- 97. Rainer Fried.** Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxid dismutase// *Biochem.J.* 1975. V.57. P. 657-660.
- 98. Schaw C.R., Prasad R.** Starch-gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes// *Biochem. Genet.* V.4. 1970. P. 297-320.
- 99. Svardson.** Chromosome studien on Salmonidae Medd// *Forsoksanst. Sotvatt. Fisk.* 23. 1945. P. 151.
- 100. Tailor S.L., Lambden M.P. and Tappel A.L.** Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis// *Lipids.* 1976. 11, № 7. P. 530-538.
- 101. Tilson M.B., Scholz A.T., White R.J. and Galloway H.** Thyroid induced chemical imprinting in ealy life stages assessment of smoltification in kokanee salmon hatcheries// 1993 Annual Report. Prepared for Bonneville Power Administration. Portland, Oregon, 1994.

Учебно-методическое пособие

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ ИХТИОФАУНЫ АЗОВО-
ЧЕРНОМОРСКОГО БАССЕЙНА**

Методическое руководство

Редактор *Ю.Е. Тютин*

Художественный редактор *Е.С. Потапенко*

Компьютерная верстка

Подписано к печати

Формат 60x90¹/₁₆. Бумага офсетная.

Печать офсетная.

Усл. печ. л. 6. Тираж 300 экз.

Издательство «Эверест»

344104, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1