

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01- Биология

Оценка влияния фитогемагглютина и изменения солёности воды на число
делящихся соматических клеток у рыб с низкой митотической активностью

Руководитель _____ доцент, к.б.н И. В. Зуев
подпись, дата должность, учёная
степень

Выпускник _____ В. Н. Урбанович
подпись, дата

Красноярск 2018

Реферат

Выпускная квалификационная работа по теме «Оценка влияния фитогемагглютинаина и изменения солёности воды на число делящихся соматических клеток у рыб с низкой митотической активностью» содержит 47 страниц текстового документа, 75 использованных источников, 4 рисунка, 7 таблиц.

МИТОГЕН, ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИН, КАРИОЛОГИЯ, ИЗМЕНЕНИЕ СОЛЁНОСТИ ВОДЫ, КОЛХИЦИН, ГИПОТОНИРОВАНИЕ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК, МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ.

Объект исследования: карась серебряный *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) и пескарь обыкновенный *Gobiogobio* (Линней, 1758).

Цель работы:

- Протестировать несколько методов повышения митотической активности для соматических тканей рыб

Задачи:

- Оценить влияние инъекции фитогемагглютинаина на митотическую активность почечной ткани карася серебряного и пескаря;
- Оценить влияние кратковременного осмотического шока на митотическую активность жаберной ткани пескаря;
- Дать сравнительную оценку эффективности существующих и использованных в работе методов повышения митотической активности рыб.

В результате проведения данной работы было определено, как изменяется количество метафазных пластинок в препаратах из рыб при использовании фитогемагглютинаина и при изменении солёности воды, в которой обитает рыба.

Были даны рекомендации, какие методы по увеличению митотической активности целесообразней использовать.

Содержание

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1 Методы изучения кариотипа рыб.....	6
1.2 Митогены.....	11
1.3 Жаберный аппарат рыб как источник делящихся клеток....	22
Глава 2. Материалы и методы.....	26
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	29
1.1 Результаты исследования.....	29
1.2 Обсуждение результатов.....	33
Глава 4. Выводы.....	38
Список литературы.....	39

Введение

В современной ихтиологии для решения ряда вопросов, связанных с исследованием эволюционных процессов, механизмом видообразования, репродуктивной изоляции, для уточнения систематического положения организмов всё чаще используется кариотип животных (Мельниченко и др., 2000; Праздников, 2013; Cataudella et al., 1977). Последние достижения в анализе кариотипа связаны с использованием и развитием методов молекулярной биологии и цитологических подходов (Пикалова, 2007). Актуальность цитогенетических исследований рыб обусловлена созданием межвидовых гибридов и изучением их биологических и хозяйственно - полезных признаков в научных целях и для товарного выращивания (Насибов и др., 2007; Макоедов, 2000; Lee, 1987).

Для изучения кариотипов необходима ткань организма, обладающая высокой митотической активностью, например, ткани почек и жабр (Gold et al., 1990; Pourkazemi et al., 2011). Но у рыб, обитающих в холодных водах, пролиферация снижена, так как они являются пойкилотермными организмами - с непостоянной температурой тела. Понижение температуры воды у пойкилотермных организмов замедляет жизненные процессы в организме (Винберг, 1976). Для получения большого количества метафазных пластинок у таких рыб необходимо использовать методики, включающие не только выделение хромосом, а также увеличение митотической активности.

На данный момент существует множество методов определения кариотипа, например, метод регенерации плавников, хромосомные препараты из эмбрионов и личинок, лимфоцитов. Также существует методика культуры тканей, но она является достаточно сложной, так как требует большой осторожности, внимания, времени и различных препаратов, чтобы обеспечить нарастание клеток. Необходимы стерильные условия, чтобы избежать заражения культуры тканей патогенами. Данная методика подходит только для

лабораторий, которые оснащены специальными оборудованями для поддержания жизни клеток (Ozouf-Costaz C. etal., 2015).

Чтобы получить большое количество препаратов и хорошего качества, некоторые ученые используют различные митогенные вещества, к которым относятся хлорид кобальта, фитогемагглютини (ФГА), хлебопекарские дрожжи, экстракт звездчатки обыкновенной и другие. Наиболее часто исследователи стали использовать ФГА, но его применение не стандартизировано, и различные виды рыб нуждаются в различных дозировках и времени выдерживания. Поэтому данный препарат требует проверки. (Моргулис, 2006; Бодоев и др., 2011; Nasrietal., 2011; Kilicetal., 2016; Ganaietal., 2011).

В настоящее время исследователи кариотипов не только рыб, но и других живых существ, используют различные методы для создания препаратов. Однако до сих пор не создан универсальный метод получения метафазных пластинок, который даст наилучший результат, то есть большое количество хромосом на одном препарате. Учёные пробуют различные методики, которые уже были созданы до них, и также пытаются внести туда свои изменения, помогающие получить наиболее хорошие результаты (Pukhtayevych, 2014; Kilic-Demiroketal, 2004; Dai, 2013).

Цель: Протестировать несколько методов повышения митотической активности для соматических тканей рыб.

Задачи:

- Оценить влияние инъекции фитогемагглютинина на митотическую активность почечной ткани карася серебряного и пескаря;
- Оценить влияние кратковременного осмотического шока на митотическую активность жаберной ткани пескаря;
- Дать сравнительную оценку эффективности существующих и использованных в работе методов повышения митотической активности рыб.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Методы изучения кариотипа рыб

Кариотип – совокупность признаков хромосомного набора, характерная для каждого биологического вида, которая включает число, размер и форму хромосом, положение на хромосомах первичной перетяжки (центромеры), наличие вторичных перетяжек и др. (Горкин, 2006). Данный термин относится к такому разделу биологии (в частности цитологии) как кариология – наука, изучающая строение и функции клеточного ядра и его структур (хромосом, ядрышка, ядерной оболочки) методами оптической и электронной микроскопии, изотропных индикаторов и другими методами (Васильев, 1985).

Первые данные о числе хромосом у рыб были получены Бохмом, Бланком и Бехренсом в конце 19 в. Согласно учёной Гас (Gas,1970), которая изучала их работы, они определили число хромосом у *Salmotrutta*(Линней, 1758)($2n = 48$). Позднее Моенкауз определил число хромосом у *Fundulusheteroclitus*(Линней, 1766) ($2n = 36$) (Moenkhus, 1904). Но была вероятность того, что эти данные не достоверны, т.к. кариология только начинала свое развитие и методы исследований были не разработаны для получения точных результатов. Согласно базе данных FishKaryome (2014), количество хромосом у *Salmotrutta*(Линней, 1758) $2n = 80$. Данное число получили 2 различные группы учёных (их исследования проводились спустя почти 100 лет после исследований Бохма, Бланка и Бехренса). А количество хромосом у *Fundulusheteroclitus*(Линней, 1766) $2n = 48$ (исследование проводилось спустя почти 70 лет). Это говорит о том, что методы кариологического исследования развивались со временем.

Кариология очень полезна в искусственной гибридизации, она позволяет получить важные результаты, связанные с гиногенезом и полиплоидией, используя различные цитогенетические методы. В настоящее время учёные пытаются вывести различные триплоидные формы рыб с хозяйственно ценными признаками. Триплоиды рыб характеризуются стерильностью. Когда

начинается сезон размножения, у триплоидов все полезные вещества уходят на наращивание мышечной массы, а не на создание икры как у диплоидов. Тем самым их стерильность является плюсом для промышленного производства (Махров, 2011).

Также кариология применяется для изучения различных хромосомных aberrаций и последующим устранением их, чтобы не допустить преждевременную гибель особей и различные болезни (Симаков, 2012). Изучаются функции клеток, ведь каждая хромосома делится на множество участков, которые имеют свои особые назначения (Назаренко, 2009). Кариологические данные помогают в решении вопросов системы и филогении для многих групп рыб (Acipenseridae, Salmonidae, Cobitidae и др.) (Васильев, 1985).

На данный момент существует несколько методик анализа хромосом. Для изучения хромосом именно рыб используют 2 основных метода:

- Анализ хромосом из почек/жабр *invivo*
- Анализ хромосом из почек/жабр *invitro*

Большинство исследователей предпочитают первый метод, потому что он наиболее прост в исполнении и даёт хорошие результаты.

Метод «*invivo*» включает в себя несколько основных стадий, некоторые из них имеют свои особенности:

- Введение ингибитора веретена делений
- Извлечение нужной ткани
- Гипотоническая обработка
- Фиксация
- Центрифугирование
- Нанесение капель клеточной суспензии на предметное стекло
- Окрашивание
- Микроскопирование
- Анализ

Метод «*invitro*» отличается от «*invivo*» тем, что ингибитор вводится только после извлечения и гомогенизации ткани. После этого производится инкубация, центрифугирование и гипотонирование с ещё одной инкубацией. А остальные шаги (начиная со стадии «фиксации») повторяются.

В качестве ингибитора исследователи используют колхицин – это алкалоид, который блокирует сборки микротрубочек (Сорочинский, 1994). Данный препарат способен останавливать деление клетки на стадии метафазы, разрушая веретено деления. Именно на этой стадии происходит изучение кариотипа, так как хромосомы максимально спирализованы и хорошо видны в микроскоп. Ввод препарата осуществляется внутримышечно под начало спинного плавника (1мл/кг), если ввести в брюшную полость, то есть большая вероятность травмировать рыбу, и она не выживет до конца действия колхицина.

Существуют множество различных ингибиторов, но учёные отдают своё предпочтение именно колхицину, ведь он был первым алкалоидом, который стали использовать в кариологии. Его ингибирующее действие было открыто в 1937 году группой американских учёных, которые выводили новые сорта растений, и с помощью колхицина они получали новые формы полиплоидных растений. Его использовали в науке более 100 лет, пока учёный Киселёв не вывел вещество колхамин из того же рода растений (Безвременник), что и колхицин. Колхамин оказался идентичным колхицину (Сало, 2008). Другое вещество – колцемид - является синтетическим аналогом колхицина и также разрушает микротрубочки веретена деления, но у него более «мягкое» действие (Воробьёв и др., 1985). Доцетаксел и винбластин также являются ингибиторами, но в основном они используются в медицине для лечения опухолей.

Для увеличения количество метафазных пластинок учёные, до ввода ингибитора, стали использовать различные вещества, которые увеличивают митотическую активность (Pukhtayevych, 2014; Kilic-Demiroketal, 2004; Dai, 2013).

В качестве исследуемого материала используют ткань с наибольшей митотической активностью. У рыб такими оказались ткани почек, печени, селезёнки, жаберного эпителия, эпителия роговицы глаза, кишечника, плавников. В большинстве случаев учёные используют ткани почек и жабр (Goldetal., 1990; Pourkazemietal., 2011). Выбор зависит также и от исследуемого объекта. Если рыба слишком маленькая, то будет неуместно использовать эпителий роговицы глаза, ткани просто не хватит, чтобы сделать достаточное количество метафазных пластинок для изучения, целесообразней будет взять тканей, которой имеется в достаточном количестве на случай совершения ошибки.

Для гипотонирования используется раствор соли KCl, чтобы разрушить клеточные стенки. Клеточная оболочка обладает таким свойством как полупроницаемость (Алексеев и др., 2005). Из-за того что снаружи маленькая концентрация соли, клетка постоянно будет пропускать внутрь воду, увеличиваясь в объёме, чтобы сохранить равновесие концентрации между раствором и содержимым клетки. Используется KCl, так как оба иона, входящие в состав соли, способны проникать через клеточную оболочку, но в данном случае клетка будет пропускать внутрь только воду. Нужно учитывать время и температуру выдерживания тканей в растворе, так как для каждого вида они свои.

Для фиксации используется фиксатор Кларка (этиловый спирт: ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1), так как он хорошо фиксирует хромосомы (Паушева, 1988). При охлаждении фиксатор образует кристаллическую массу, которая быстро проникает в ткани, вызывает их набухание, хорошо сохраняет формы хромосом и разрушает митохондрии и аппарат Гольджи. Допустима замена уксусной кислоты на пропионовую, при этом соотношение компонентов остаётся таким же (3:1). Во время фиксации нужно менять фиксатор несколько раз (Nettoet. al, 2007), так как он нагревается и хуже действует.

Центрифугирование используют для разделения частиц с разной скоростью осаждения в центробежном поле. Центрифугировать клеточную

суспензию необходимо при 1200-1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре, чтобы получить клеточный осадок на дне пробирки (Nettoet. al, 2007). Но некоторые исследователи уделяют этому процессу меньше времени и при этом добиваются хороших результатов.

Большинство исследователей используют рутинную окраску. Она достигается путем простого окрашивания полученных хромосомных препаратов красителем Романовского - Гимза (азур - эозином) без какой - либо их предварительной обработки (Викторова, 2012). Такая окраска приводит к сплошному прокрашиванию хромосом по длине.

На сегодняшний день существует множество методик, по которым работают учёные, чтобы выделить хромосомы. Но ни одна из них не является универсальной, так как каждый вид обладает своими физиологическими особенностями. Для каждого метода существуют свои определённые стандарты применения.

В последнее время стали чаще использовать более упрощённые методики, то есть те, в которых имеется наименьшее количество стадий и которые занимают небольшое количество времени, но при этом дают хорошие результаты. Одной из таких является методика Крысанова из института проблем экологии и эволюции РАН в Москве. Он предложил метод, который исключает стадию центрифугирования и в котором допускаются значительные вариации продолжительности и температуры гипотонической обработки. Его можно использовать для различных групп мелких позвоночных животных (Крысанов и др., 2009; Singhatal., 2013; Knytlatal., 2013; Fredga, 1987).

До того как появился упрощённый метод Крысанова, учёные, в основном, использовали методику Васильева, которая включает в себя стадию центрифугирования. Эту методику используют и до сих пор, но с некоторыми изменениями, которые требуют определённые виды, а именно это стадия гипотонирования, а также концентрация ингибитора и его количество (Kovalevatal., 2014; Boronatal., 1997; Esmaeiliatal., 2009; Fordatal., 1963; FishKaryome, 2014; Праздников, 2013).

Существует методика, при которой приготовление препаратов не требует умерщвления рыбы. Данная методика включает в себя работу с регенерирующей тканью плавников, так как в ней присутствуем большое количество делящихся клеток. Её суть заключается в том, что у здоровой рыбы отрезается часть хвостового плавника, и затем сама рыба выпускается обратно в аквариум, где обитает в прежних условиях 1 неделю. А затем регенерированную часть плавника отрезают и проводятся дальнейшие действия, связанные с выходом хромосом из клеток (Semberetal., 2015; Shaoetal., 2010; Ozouf-Costaz C. etal., 2015).

1.2 Митогены

Митоз — генетически детерминированный процесс, основная задача которого — равное распределение наследственного материала и субклеточных структур в две образующиеся дочерние клетки. Нарушение его чревато дестабилизацией генома и онтогенетическими нарушениями на разных уровнях структурной организации (Талакина и др., 2013). Это процесс, в котором клетка последовательно проходит различные стадии, без их пропуска или возврата к предыдущим. Начав деление, клетка его заканчивает синтезом ДНК и раздвоением (Королёв, 2015).

В 1970-х годах началась расшифровка и детальное изучение веществ, которые способны влиять на митотическую активность (Ченцов, 2004).

Клеточное деление регулируют митогенные факторы. Они вырабатываются в тканях и активизируют деление клеток. Следовательно, митогены — это вещества, способные индуцировать митотическое деление клеток. Они запускают пути передачи сигнала с вовлечением в процесс митогенактивируемой киназы и в итоге вызывают переход клеток из фазы покоя в митоз (Савилова и др., 2013).

Для получения более препаратов с большим количеством метафазных пластинок, необходимо побудить клетки к митозу. Существуют различные

средства для ускорения процессов восстановления тканей, например, метацил, френолон, ретаболил, сиренар и другие. Однако известные средства стимулируют, в основном, только гипертрофию клеток повреждённого органа. Но в 1982 г. было изобретено вещество, которое относится к экспериментальной медицине и может быть использовано в эксперименте на животных и изолированной культуре клеток для стимуляции митоза, оно называется эвгенол (1 – окси – 2 – метокси – 4 – аллилбензол) – компонент эфирного масла многолетнего полукустарникового растения базилика эвгенольного из семейства губоцветных (Богущий и др., 1982).

Серии экспериментов показали, что 0,005% - ная эмульсия эвгенола способствует значительному повышению включения изотопа H^3 в клетки. Это свидетельствует о повышении интенсивности метаболической и митотической активности клеток. Средство может использоваться для ускорения регенерации тканей при проведении экспериментов, размножения культур клеток, необходимых для постановки опытов, получения данных для выявления скрытых нарушений в генетическом аппарате клеток при их делении (Богущий и др., 1982).

В 2009 и 2010 гг. в городе Советская Гавань и его окрестностях были отловлены мелкие серые полевки, принадлежащие к роду *Microtus Shrank* (Paula, 1798). Предполагалось, что из представителей данного рода здесь обитает только изолированная популяция полевок Максимовича *Microtus maximowiczii* (Schrenck, 1858). Но по внешним признакам отловленные особи не принадлежали ни к одному виду серых полевок, распространенных на данной местности. По предварительному анализу внешних морфологических и одонтологических признаков, эти полевки наиболее близки к полевам группы «arvalis», основной ареал которых расположен в европейской части материка. Учитывая это, а также сложность видовой идентификации полевок рода *Microtus* в связи с их слабой морфологической дифференциацией, необходимо было провести комплексный таксономический анализ с использованием морфологических и хромосомных методов, надежно идентифицирующих виды

этого рода. В качестве стимулятора митоза был использован раствор пекарских дрожжей (0,5 мл на 25 г веса животного), который вводился подкожно за сутки до забоя. В результате были получены хорошие препараты, благодаря которым смогли различить данные два вида *Microtus rossia meridionalis* (Ognev, 1924) и *Microtus arvalis* (Pallas 1779). Данные виды отличаются только по числу и морфологии хромосом (Картавцева и др., 2011).

В 2006 г. проводились исследования по влиянию кобальта в различных количествах на живой организм. Были осуществлены эксперименты *in vivo* на крысах, мышах и собаках, которым подкожно вводили раствор $CoCl_2$ в физиологическом растворе (0,9% раствор $NaCl$) в стандартной дозе 250 мкмоль/кг массы животного. Животным контрольных групп вводили подкожно физиологический раствор в том же объеме. В первые часы после введения хлористого кобальта животным произошла активация эритроидного кроветворения, выражающаяся в изменяющемся соотношении содержания эритроидных клеток разных степеней зрелости и монотонно усиливающейся митотической активности. А при добавлении хлорида кобальта в культуральную среду на 7 - е сутки культивирования в среде с 10 % сыворотки было обнаружено усиление пролиферативной активности фибробластов. В результате исследователи предположили, что хлорид кобальта при введении в культуру клеток вызывает усиление клеточной пролиферации. Подтверждением этого явилось также возрастание содержания белка в клеточной культуре, следовательно, хлорид кобальта может являться стимулятором митоза (Моргулис и др., 2005).

В большинстве случаев используется препарат фитогемагглютинин (ФГА) - сильный митоген, который способствует переходу клеток к делению, и благодаря этому широко применяется в культуральных средах. Впервые он был выделен П. Новеллом в 1960 году (Арефьев и др., 1995).

Митогены находят широкое применение в медицине. Например, по изучению нарушения цитокиновой регуляции у пациентов с диабетической ретинопатией необходимо получить культуру клеток крови. Чтобы было

большое количество необходимого, материала для исследования использовался митоген ФГА с липополисахаридом, с целью увеличения количества продукции провоспалительных цитокинов. В результате было получено почти в 2 раза большее количество цитокинов, чем без использования митогена (Витовская и др., 2016).

Исследования особенностей влияния СВЧ - излучения частотой 1000 МГц на спонтанную и митоген - индуцированную продукцию цитокинов клетками цельной крови, также использовался ФГА, но не отдельно, а вместе с конканавалином Аилипополисахаридом (Бондарь, Терехов, 2015). А при исследовании цитогенетических показателей у больных с острыми одонтогенными воспалительными заболеваниями лица использовали только ФГА без других стимуляторов митоза (Коротких, Тобоев, 2010).

Многие исследователи, зная положение о большой чувствительности к цитостатикам опухолей с высоким уровнем пролиферации, которое предполагает что предварительная стимуляция пролиферации должна повысить цитотоксический эффект противоопухолевых препаратов проверяли его на мышцах. В качестве моделей были использованы гормоночувствительные перевиваемые опухоли мышей – аденокарцинома молочной железы Са – 755 и рак шейки матки РШМ – 5. В качестве стимуляторов пролиферации были использованы эстроген (для стимуляции эстрогеночувствительных клеток, так как эстрогены индуцируют интенсивный митогенез в тканях, содержащих специфические рецепторы (Печерский и др., 2005)) и оксикобаламин (для стимуляции гормононечувствительных клеток). Но использование данных препарат не дало ожидаемого результата, так как в большинстве опытов не удалась усилить противоопухолевое воздействие цитостатиков. В итоге применяется комбинацию цитостатика (циклофосфан) с антиэстрогеном (Кубасова, Софьина, 1993).

При изучении цитогенетических и молекулярно – биологических повреждений и проявления адаптивного ответа в поколениях облучённых лимфоцитов крови человека исследуются абберации хромосом и степени

фрагментации ДНК методом ДНК – комет. Он проводится на стимулированных к делению фитогемагглютинином (ФГА) лимфоцитах периферической крови в необлучённых поколениях облучённых клеток в разных митотических циклах. Также ФГА - стимуляция используется для изучения формирования адаптивного ответа в разных митотических циклах (Рябченко и др., 2009).

В опытах *invitro* показано, что холестероли фитогемагглютинин влияют на экспрессию генов раннего ответа, усиливая транскрипционную активность определённых генов, определяя тем самым способность клеток к пролиферации. В исследовании использовалась культура макрофагов, в которую добавляли ФГА в концентрации мкг/мл, чтобы стимулировать митотическую активность. При стимуляции с помощью ФГА количество клеток в культуре с течением времени возрастало с максимумом к 24 часам наблюдения. При этом в ФГА - стимулируемых клетках уровень холестерола резко возрастал, начиная с 6 часов наблюдения, и к 24 часам превышал контрольный уровень в среднем в 2 раза. Внесение холестерола в культуру макрофагов в процессе экспериментов само по себе не вызывало заметного усиления пролиферации. Однако при ФГА - стимулированной митогенной активации клеток холестерол в диапазоне концентраций 3,9—6,5 ммоль оказывал комитогенный эффект, при этом количество клеток в культуре возрастало максимально на 158 %. ФГА - индуцированная пролиферативная активность усиливается под влиянием холестерола (Трофимов и др., 2009).

Митогенный эффект был обнаружен при воздействии никотина. Он способен повышать синтез ДНК в гладкомышечных клетках сосудов и адвентициальных фибробластах. Митогенный эффект никотина известен *invivo* как канцерогенный; участие его в атеросклеротическом процессе проявляется и во взаимодействии с другими системами. В частности, никотин усиливает синтез ДНК, индуцированный ангиотензином II. Никотин активирует сигнальные молекулы - ERK киназу, тирозин - и серин - фосфорилирование активаторов транскрипции STAT1 и STAT3 и p38 MAPK протенкиназу в гладких мышцах и фибробластах. p38MAPK известна как критический

компонент сигнального пути гладких мышц, играющий решающую роль в гипертрофии сосудов (Зубаирова и др, 2006).

В настоящее время существуют митогены, которые способны влиять на определённые структуры организма. Современные исследования позволили установить, что среди внутриклеточных регуляторов, контролирующих рост и развитие сосудов, важное место занимают биологически активные полипептиды. Среди достаточно большого числа факторов роста, важную роль в процессах ангиогенеза играют сосудисто - эндотелиальный фактор роста (СЭФР), эпидермальный фактор роста (ЭФР), трансформирующий фактор роста (ТФР). Причем два последних фактора роста стимулируют экспрессию гена первого (Орлов и др., 2008).

Митогенной активностью обладает инсулин. Действие инсулина и его митогенные и анаболические качества в различных тканях хорошо охарактеризованы. Данные ряда исследований свидетельствуют о том, что послеобеденное увеличение уровня инсулина ассоциировано с повышением уровня синтеза белка в скелетных мышцах (Грязных, 2011).

Для увеличения пролиферации клеток, помимо использования митогенов, существует метод введения изучаемого объекта в состояния шока. Для пресноводных видов рыб такой метод подразумевает изменение солёности воды, в которой она обитает. Данный метод не имеет широкого применения, однако уже были получены результаты, которые свидетельствуют о том, что данный метод увеличивает количество chloride cells, которые находятся в жаберном эпителии. После переноса рыбы в солёную воду, на 2 - 4 день наблюдается увеличение митотической активности в клетках жаберного эпителия (Wong, Chan, 1999; Carmona et al, 2004; McCormick, 2001).

Существуют различные способы приготовления экстрактов ФГА. Например, высушенные семена размалываются в ступке и просеиваются через сито для получения муки. Экстрагируется 1 г муки с добавлением в неё 10 мл стерильного физиологического раствора с pH = 7,0 (первые 2 часа – при 37°C, а последующие 18–20 часов – при 7°C). Жидкость центрифугируется,

фильтруется и сохраняется при 7°C в закрытой пробирке без добавления антибактериальных веществ. Экстракты хранятся в течение 3 недель при температуре 7°C. Большинство готовых экстрактов представляют собой жидкость, похожую на сыворотку светлого желтовато - зеленоватого цвета с рН 5 – 6. Из семян бобовника анагировидного, или золотого дождя (*Laburnumanagyroides L.*), раkitника русского (*CytisusruthenicusFisch, 1958*), лядвенца четырехгранного (*Lotustetragonolobus L., 1753*) и раkitника сидячелистного (*Cytisussessilifolius L.*) можно получить экстракты, которые содержат фитогемагглютинин. Некоторые исследователи считают, что территориальные условия произрастания растений оказывают влияние на наличие в семенах ФГА и его свойства (Циркин и др., 2017).

Методика приготовления экстракта из семян овсяницы луговой (*FestucapratensisHuds.*), подсолнечника (*Helianthus L., 1753*) и из кожуры апельсина (*Citrussinensis (L.)Osbeck.*), заключается в том, что экстракция размолотых семян или кожи проводилась 0,85 % раствором хлористого натрия в течение двух дней при 4°C. Вес сухой навески относился к объему раствора как 1:5. Вытяжки фильтровались и хранились при –4°C (Циркин и др., 2017).

Содержание лектина в семенах фасоли намного больше, чем у большинства растений и составляет 1–3 г на кг семян. В экстрактах семян североамериканской фасоли *GreatNorthernbean*, которая является разновидностью фасоли обыкновенной (*Phaseolusvulgaris L.,1753*), есть два лектина, GNL-1 и GNL-2. Оба белка содержат три субъединицы: альфа, бета и гамма, каждая из которых может связываться с углеводными остатками, но при этом они не проявляет специфичность в отношении моносахаридов и дисахаридов. Оба белка являются гликопротеинами, то есть содержат углеводы (в GNL-1 до 5,1 %, в GNL-2 до 4,5 %). GNL-1 вызывает митогенный эффект, который у GNL-2 отсутствует. Это подтверждается известными данными о способности экстракта фасоли вызывать митогенный эффект, то есть активировать переход клеток из стадии покоя в митоз (Циркин и др., 2017).

Целью создания фитогемагглютинина является сокращение времени

процесса и повышение специфической активности. Его создание относится к медицине, а именно к химико-фармацевтической промышленности (Дихтярев и др., 2000).

Существуют способы получения веществ, обладающих митогенной активностью, путем экстракции тонко измельченной муки фасоли сорта "Красногвардейская" водой, подкисленной концентрированной соляной кислотой до рН 1,0, в присутствии антиоксиданта с последующим фракционным высаливанием кристаллическим сульфатом аммония, диализом, очисткой колоночной хроматографией на сефадексе G - 100 и сублимационной сушкой целевого продукта. Стадия очистки сложная, целевой продукт, получаемый по этому способу, нестерилен, и это сужает область его использования. Более приемлемым способом получения фитогемагглютинаина является экстракция измельченных семян фасоли белой 0,1 н. раствором соляной кислоты с последующим осаждением сульфатом аммония, диализированием, стерильной фильтрацией и лиофильной сушкой. Недостатки данного способа - длительность процесса, недостаточно высокие специфическая активность и выход целевого продукта, получаемого по способу – прототипу (Дихтярев и др., 2000).

Целью способа является повышение специфической активности и сокращение времени. Поставленная цель достигается тем, что измельченные семена экстрагируют в кислой среде с последующим осаждением экстракта, стерилизующей фильтрацией и сублимационной сушкой, согласно изобретению, семена фасоли сорта "Гайдарская" экстрагируют буфером Мак - Ильвейна при рН 2,6 - 3,2 и соотношении сырье:экстрагент как 1:4 (- 6), осаждение экстракта проводят ацетоном трехкратно при соотношениях 1:0,4(- 0,6) (Дихтярев и др., 2000).

Например, 1 кг семян фасоли сорта "Гайдарская" измельчают в муку. Проводят экстракцию 5 л экстрагента с рН 3,0 (буфер Мак - Ильвейна) в течение 2 часов при перемешивании в обычных условиях. Затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 минут. Полученный экстракт 3,3

л осаждают при перемешивании 1,65 л холодного ацетона при температуре 4°C. Смесь оставляют в холодном месте на 30 мин. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок отделяют на центрифуге (30000 об/мин) в течение 20 мин. Полученный осадок отбрасывают. К раствору вновь прибавляют при перемешивании 4,95 л холодного ацетона и оставляют для образования осадка на 1 час в холодном месте при температуре 4°C. Затем удаляют надосадочную жидкость, осадок отделяют на центрифуге при 3000 об/мин в течение 2-3 минут и растворяют в 700 мл дистиллированной воды. Осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут, затем отбрасывают, а к надосадочной жидкости прибавляют 700 мл холодного ацетона. После отстаивания в течение 30 минут в холодном месте при 4°C осадок отделяют центрифугированием, растворяют в центрифужных стаканах в 600 мл воды. Осадок отделяют, а надосадочную жидкость высушивают сублимацией в вакууме в условиях, создающих стерильность работы. Раствор перед этим пропускают через микропористые капроновые мембраны с размером пор 0,3-0,8 мкм и один слой фильтровальной бумаги. Фильтрат в стерильных условиях разливают по 1 мл во флаконы. Предварительное замораживание проводят в течение 5-6 ч при T=-(25-30)°C. Сушку проводят при 30°C до полного удаления влаги во флаконах. После этого флаконы закрывают резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками. Выход после одной загрузки составляет 6,4 0,3 г фитогемагглютина с активностью 40 митотических пластин на 0,2 мг препарата (Дихтярев и др., 2000).

В последующих примерах режимы оставались те же, но менялось влияние рН экстрагента на митогенную активность и выход целевого продукта (таблица 1)

Таблица 1 - Влияние рН экстрагента на митогенную активность и выход ФГА (Дихтярев и др., 2000)

Пример	рН экстрагента	Митогенная активность пластин на 0,2 мг	Выход продукта, кг

2	2,2	350	0,0044
3	2,4	380	0,0051
4	2,6	410	0,0057
5	2,8	440	0,0060
6	3,0	460	0,0066
7	3,2	450	0,0064
8	3,4	420	0,0055
9	3,6	390	0,0049

Виден прирост митогенной активности параллельно при увеличении выхода целевого продукта в кислой области.

В последующих опытах при тех же режимах показано влияние соотношения сырья и экстрагента на митогенную активность и выход целевого продукта. Как следует из данных (таблица 2), оптимальным значением, при котором получалось наибольшее количество целевого продукта, является соотношение 1:5.

Таблица 2 – Влияние соотношения сырья и экстрагента на митогенную активность и выход ФГА (Дихтярев и др., 2000)

Пример	Соотношения сырья и экстрагента	Митогенная активность пластин на 0,2 мг препарата	Выход ФГА, кг
10	1:1	-	-
11	1:2	330	0,0039
12	1:3	380	0,0048
13	1:4	400	0,0054
14	1:5	420	0,0063
15	1:6	390	0,0067
16	1:7	370	0,0071
17	1:8	350	0,0078

В последующих экспериментах (таблица 3) представлены данные по влиянию объема ацетона на митогенную активность и выход целевого продукта при втором осаждении. Оптимальным объёмом, позволяющим достигнуть максимальной митогенной активности, является соотношение смесь - растворитель 1:1. Последующее увеличение приводит к уменьшению активности целевого продукта.

Данные, приведенные в таблице 4, показывают, что при осуществлений данного способа значительно сокращается время его проведения, повышается специфическая активность целевого продукта.

Таблица 3 – Зависимость митогенной активности и выхода ФГА от объёма ацетона, взятого для второго переосаждения

Пример	Объём смеси экстракта ФГА и ацетона, л	Объём ацетона, л	Соотношение смесь: растворитель	Митогенная активность пластин на 0,2 мг препарата	Выход продукта, кг
18	4,95	1,24	1:0,25	320	0,0041
19	4,95	2,48	1:0,5	370	0,0047
20	4,95	3,71	1:0,75	390	0,0051
21	4,95	4,95	1:1	460	0,0063
22	4,95	6,19	1:1,25	450	0,0063
23	4,95	7,42	1:1,5	410	0,0072

Таблица 4 – Влияние ацетона на выход и митогенную активность при выделении целевого продукта (Дихтярев и др., 2000)

Пример	Объём раствора ФГА, л	Объём ацетона, л	Соотношение раствор: ацетон	Митогенная активность пластин на 0,2 мг препарата	Выход продукта, кг
24	0,8	0,2	1:0,25	310	0,0020

25	0,8	0,4	1:0,5	350	0,0040
26	0,8	0,6	1:0,75	390	0,0045
27	0,8	0,8	1:1,0	440	0,0061
28	0,8	1,0	1:1,25	430	0,0060
29	0,8	1,2	1:1,5	410	0,0059
30	0,8	1,4	1:1,75	400	0,0060
31	0,8	1,5	1:1,9	380	0,0062
32	0,8	1,6	1:2,0	350	0,0065

1.1 Жаберный аппарат рыб как источник делящихся клеток

Известно, что наиболее важными осморегуляторными органами у рыб является жабры, которые характеризуются относительно медленным поглощением Na и Cl в условиях низких солености, в пресной воде, и относительно быстрой секреции Na и Cl в условиях высокой солености, в морской воде (Pereira, Caetano, 2009).

Соленость внутренней среды рыб составляет примерно одну треть от солености морской воды. Поэтому в морской воде происходит диффузия ионов в организм, а в пресной, наоборот, из организма во внешнюю среду. Чтобы компенсировать эти явления, в морской воде рыбам необходимо выделять ионы, а в пресной – адсорбировать. Если у высших позвоночных основным осморегулирующим органом являются почки, то у рыб осморегулирующие функции выполняют почки, кишечник и жабры, причем ведущая роль в осморегуляции принадлежит именно жабрам (Evans, 1993).

Жабры - это главный осморегуляторный орган у рыб, он очень чувствителен ко многим факторам, включая стресс, загрязнение и изменения солености окружающей среды. Хотя есть заметные различия в анатомии жабр среди различных групп рыб, клетки, составляющие жаберный эпителий, очень схожи (Carmona et al., 2004). Жаберный эпителий стратифицирован и состоит из нескольких типов клеток, включая слизистые и chloride cells, в дополнение к

вкусовым рецепторам и недифференцированным клеткам. Chloridecells были впервые идентифицированы KeysiWilmer (1932), которые описывали клетки, богатые митохондриями. Chloridecells большие, разбросанные на пластинчатой поверхности, богатые митохондриями клетки, которые участвуют в процессе активного переноса ионов (рисунок 1). Из-за большого количества присутствующих митохондрий, они также известны как клетки, богатые митохондриями (Pereira, Caetano, 2009).

Chloridecells- это один из наиболее хорошо исследованных типов клеток жаберного эпителия рыб, именно они отвечают за обмен ионов (Grecoetal, 1996). У рыб адаптированных к морской воде в жаберном эпителии присутствуют chloridecellsmорского типа и вспомогательные клетки. Эти два типа клеток формируют многоклеточные комплексы в эпителии. У рыб, адаптированных к пресной воде, различают два типа собственно chloridecells, это α - chloridecellsи β - chloridecells. Но у рыб, которые адаптированы к пресной воде, нет вспомогательных клеток. У эвригалинных видов и мигрирующих видов, обитающих преимущественно в пресной воде, при переносе в морскую воду α - chloridecells трансформируются в β - chloridecells, появляются вспомогательные клетки и начинается формирование многоклеточных комплексов. Повышается проницаемость межклеточных контактов. При переносе рыб из морской воды в пресную наблюдаются обратные процессы (Корниенко, 2008).

Проводилось исследование, где были раскрыты основные различия в chloridecells жаберного эпителия между пресноводными и морскимивидами рыб. Солевые условия определяют увеличение числа и размер chloridecells(Carmonaetal, 2004).

Chloridecellsбогаты митохондриями и обладают специфическими ультраструктурными особенностями, которые характерны для клеток, участвующих в ионном транспорте. Одно из самых крупных ультраструктурных изменений, связанных с увеличением их размера, было значительным увеличением базолатеральной трубчатой системы, которая

связана с повышенной активностью Na^+ / K^+ -АТФазы, фермента, локализованного в мембране трубчатой системе. Многочисленные митохондрии этой сети отражают высокие энергетические потребности ионного обмена (Carmonaetal, 2004).

Что касается гипертрофии этого типа клеток, то в проводившихся исследованиях, раскрывается существенное ультраструктурное изменение. Оно ранее не было выявлено – это значительное увеличение мембранных цистерн из аппарата Гольджи, которые идёт от центрак базолатеральной поверхности происходит увеличение плазматической мембраны, совпадающее с увеличением базолатеральной трубчатой системы и увеличение активности ион – транспортного белка Na^+ / K^+ -АТФазы. Это увеличение было обнаружено в предварительных исследованиях Моралеса в 2001 году. Точно так же Cataldiv 1995 году и McKenzieв 1999 году в своих исследованиях нашли аналогичный ответ фермента, демонстрирующий значительно более высокую активность, чем в пресноводных видах. Наличие данного ответа было описано как отличительная особенность chloridecells морских видов рыб или как структурное изменение, которое происходит, когда вид переходит из пресной в солёную воду (Carmonaetal, 2004).

Исследования показывают, что chloridecells являются центром активных процессов ионного переноса, связанных с ионной регуляцией у морских и пресноводных рыб. Из – за этого, особенно у морских видов, значительная часть всей энергии используется различными транспортными АТФазами, из-за гидролиза АТФ. Chloridecells являются важным центром поглощения NaCl в пресной воде, благодаря которому пресноводные рыбы адаптируются к солёной воде, следовательно, пролиферация chloridecells в воде с низким содержанием NaCl может быть важным механизмом, способствующим усилению пропускной способности NaCl жабрами (Pereira, Caetano, 2009).

Chloridecells больше и более многочисленны у морских видов, чем у пресноводных рыб и являются самыми крупными клетками, приспособленными к более концентрированным средам. В неблагоприятных ионных условиях или

при контакте с токсичными агентами, chloride cells начинают активно делиться в жаберных нитях (Pereira, Caetano, 2009).

Chloride cells имеют более высокие скорости метаболизма, чем другие клетки жабр, и скорости метаболизма. Они непосредственно влияют на количество близкорасположенных chloride cells, что может вызвать их деление (Pereira, Caetano, 2009).

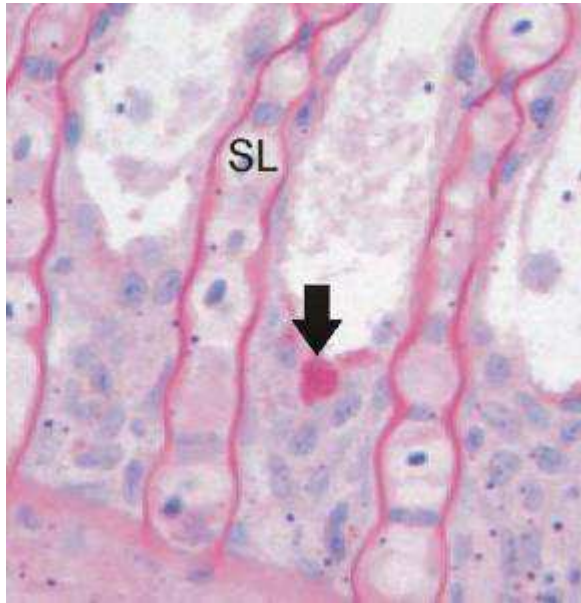


Рисунок 1 – Эпителий жаберных нитей; SL – жаберная нить; стрелкой указан chloride cell (Pereira, Caetano, 2009).

Глава 2. Материалы и методы

В период с февраля 2018 г. по май 2018 г. на базе кафедры водных и наземных экосистем Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ были проведены серии экспериментов по определению влияния фитогемагглютинина и изменения солёности воды на число делящихся соматических клеток у рыб с низкой митотической активностью.

Материал был собран в весеннее время 2018 г. Пескарь обыкновенный *Gobiogobio* (Линней, 1758) был пойман в реке Кача в количестве 32 экземпляров, из них было получено 128 препаратов; карась серебряный *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) был пойман на реке Бугач в количестве 2 экземпляра, из них было получено 8 препаратов.

На первом этапе эксперимента исследуемой рыбе вводился раствор фитогемагглютинина в спинную мышцу за неделю до ввода ингибитора. Данный препарат брался в количестве 0,2 мг на 10 г исследуемой рыбы.

Через неделю рыбам вводился 0,04% раствор колхицина. Спустя 40-60 мин из умерщвлённых рыб вынималась исследуемая ткань, в данном эксперименте ею являлась почка и предпочка.

Рыба располагалась вентральной поверхностью вверх, делался поперечный разрез на основании перешейка (рисунок 2, А), а затем продольное отверстие до ануса (рисунок 2, В). Затем разделялись поперечно разделенные пополам части, чтобы был хорошо виден пищеварительный тракт (рисунок 2, С). После этого вырезается область между глоткой и пищеводом, внутренности перемещаются к задней части тела при помощи пинцета, до тех пор, пока не будет видна передняя часть почки (рисунок 2, D). Полностью удаляется кишечник, чтобы была видна задняя часть почки (рисунок 2, E). Ткань почки бралась с помощью пинцета (Ozouf-Costazetal., 2015).

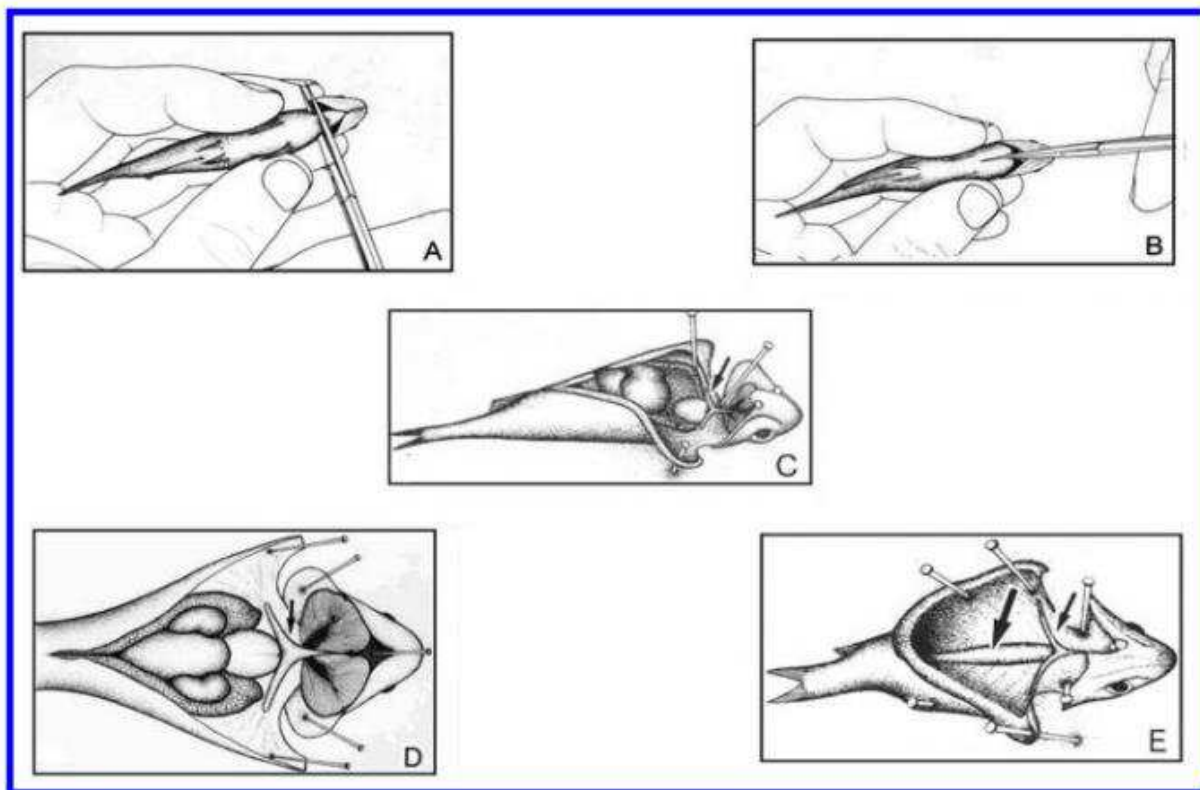


Рисунок 2 – Методика взятия почки и предпочки у рыб малого размера. Маленькая стрелка указывает на предпочку, а большая – на почку (Ozouf-Costazetal., 2015).

Затем была стадия гипотонирования. Извлечённая ткань помещалась в ёмкость с раствором хлористого калия (0,56 г KCl на 100 мл дистиллированной воды) на 35 минут. Объём раствора превышал объём ткани в 10 раз.

На следующей стадии исследования ткань переносилась из гипотонического раствора в ёмкость с 10 мл свежеприготовленного охлаждённого фиксатора (этиловый спирт и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) на 5 минут.

Потом на 4 минуты ткань помещалась в 50% раствор уксусной кислоты, предварительно нужно было удалить избыток фиксатора на фильтровальной бумаге.

Затем полученная суспензия клеток набиралась при помощи пипетки Пастера и наносилась на предварительно нагретые предметные стёкла на плитке до

70°C, по 3 капли суспензии на стекло. Избыток суспензии сразу же удалялся пипеткой с предметного стекла.

Полученные препараты окрашивались по Романовскому - Гимза.

После того как предметные стёкла полностью просохли, производился анализ полученных препаратов при помощи светового прямого микроскопа Carl ZEISS PrimoStar на увеличении 20-40X.

В качестве контрольной группы использовались рыбы того же вида, обитающие в таких же условиях, что и исследуемая группа особей. Их исследование производилось по вышеописанной методике, за исключением ввода митогена - фитогемагглютинина.

В эксперименте с изменением солёности воды также участвовали 2 группы рыб - исследуемая и контрольная. В качестве исследуемой выступала та группа, которая в течение 4 дней обитала в солёной воде (концентрация соли - 5 гNaCl на литр), а в качестве контрольной - те особи, что обитали в пресной воде (Rosicchietal, 2001). Эксперимент проводился по вышеописанной методике, только без использования митогена в обеих группах, а в качестве исследуемого органа брали жабры (Крысанов и др., 2009; Rosicchietal, 2001).

С одной рыбы было получено 4 препарата. Производился подсчёт метафазных пластинок во всех каплях, а также среднее число пластинок на 1 каплю в препарате. За ошибку было принято значение, полученное как среднее число метафазных пластинок на 4 стекла, то есть на 1 рыбу. Также был произведён однофакторный дисперсионный анализ при помощи программы Excel 2010.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Результаты исследования

В ходе проведённых экспериментов с использованием митогена фитогемагглютинина выживаемость всех особей составила 100 %. В данном эксперименте в общей сумме было взято 20 рыб различного пола, среди них были 2 особи карася серебряного *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) и 18 особей пескаря обыкновенного *Gobiogobio* (Линней, 1758). Пол данных особей не учитывался, так как митоген действовал на соматические клетки. Из всех выбранных рыб 10 было взято для контрольного значения, они обитали в таких же условиях и на протяжении такого же времени (1 неделя), что и исследуемая группа.

[изъято 9 страниц]

Глава 4. Выводы

- 1) При использовании раствора ФГА, взятого в концентрации 0,002%, действовавшего в течение 7 дней, количество метафазных пластинок увеличилось в 2,01 раза;
- 2) У рыбы, обитавшей в течение 4 дней в воде, где солёность составляла 5‰, количество метафазных пластинок увеличилось в 2,07 раза;
- 3) После исследования существующих методов, по увеличению пролиферации соматических клеток, было выявлено, что наилучшими являются методы с использованием:
 - 0,2% раствора ФГА, где применяется 0,04% раствор колхицина – увеличение метафазных пластинок в 2,01 раза;
 - при воздействии личинок глохидий в течение 4 дней количество метафазных пластинок увеличивается в 10 раз;
 - при введении рыбы в состояние осмотического шока пролиферация увеличивается в 2,07 раз (солёность воды 5‰).

Список литературы

- 1) Алексеев, В. И. Прикладная молекулярная биология / В. И. Алексеев, В. А. Каминский. – URSS - Москва, 2005. – 200 с.
- 2) Арефьев, В. А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / В. А. Арефьев. - издательство ВНИРО – Москва, 1995. – 407 с.
- 3) Богуцкий, Б. В. Стимулятор митоза / Б. В. Богуцкий, В. В. Николаевский, А. Е. Еременко, А. А. Тихомиров, М. И. Говорун, И. К. Иванов, В. И. Ключников. - Москва, 1982. - 3 с.
- 4) Бодоев, А. В. Влияние экстракта зубчатки обыкновенной на митотическую активность / А. В. Бодоев, П. В. Алексеев // Вестник Бурятского государственного университета. – 2011. – №. 12. – С. 51 – 53.
- 5) Бондарь, С.С., Продукция цитокинов у пациентов с субклиническим инфекционно-воспалительным процессом и ее коррекция низкоинтенсивным излучением частотой 1000 мгц / С. С. Бондарев, И. В. Терехов // Вестник новых медицинских технологий. - 2015. - С. 669 - 671.
- 6) Васильев, В. П., Эволюционная кариология рыб/ В. П. Васильев. – издательство «Наука» - Москва, 1985. – 304 с.
- 7) Викторова, Т. В. Цитология и генетика// В 2 ч. Ч.1/ Т. В. Викторова. - Уфа - 2012. – 192 с.
- 8) Винберг, Г. Г. Зависимость энергетического обмена от массы тела у водных пойкилотермных животных / Г. Г. Винберг //Журн. общ.биологии. – 1976. – Т. 37. – №. 1. – С. 56-70.
- 9) Витовская, О. П. Нарушения цитокиновой регуляции у пациентов с диабетической ретинопатией / О. П. Витовская, Т. С. Ахмад, Н. Г. Бычкова // Оригінальні дослідження. - 2016. - №. 11. - С. 93 – 95.
- 10) Воробьев, И. А. Центриоли и микротрубочки в интерфазных клетках при воздействии коллемеида. Эффект, зависимый от концентрации и времени

действия яда / И. А. Воробьев, Ю. С. Ченцов // Цитология. – 1985. – Т. 27. – №. 10. – С. 1101 – 1105.

- 11) Горкин, А. П., Биология/ А. П. Горкин. –издательство «Росмэн» – Москва, 2006. – 560 с.
- 12) Грязных, А. В. Гормональные и метаболические сдвиги при физической нагрузке и приёме пищи / А. В. Грязных. – издательство Курганского гос. ун-та – Курган, 2011. – 92 с.
- 13) Дихтярев, С. И. Способ получения фитогемагглютинина / С. И. Дихтярев, З. Ф. Коваленко, Н. Г. Кашкарова, В. Т. Чернобай, В. Н. Сухинин, Ф. А. Конев, В. Г. Шахбазов, Л. М. Чепель, Н. Г. Стрижельчик // Патент Российской Федерации. – 2000. - №. 31. – 5 с.
- 14) Картавцева, И.В. Инвазия полевки *Microtus Rossiaemeridionalis* на территорию дальнего востока России / И. В. Картавцева, М. П. Тиунов, А. С. Лапин, Н. П. Высочина, А. В. Рябкова // Российский журнал биологических инвазий / Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. - 2011. - №.4. – С. 17 – 24.
- 15) Корниенко, М. С. Структурно - функциональная характеристика ионоцитов жабр и почки некоторых видов рыб при изменении солёности окружающей среды : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.25 / Корниенко Михаил Сергеевич. – Владивосток – 2008. – 114 с.
- 16) Королёв, В.А. Биология / В. А. Королёв, С. А. Кутя, Т. П. Сатаева. – издательство «Издательские решения» - Москва, 2015. – 86 с.
- 17) Коротких, Н. Г., Значение цитогенетических показателей у больных с острыми одонтогенными воспалительными заболеваниями лица, осложненными пролонгированным течением / Н. Г. Коротких, Г. В. Тобоев // Вестник ВолГМУ. - 2010. - №. 35. - С. 36 - 39.
- 18) Крысанов, Е. Ю. Простой метод приготовления препаратов хромосом мелких млекопитающих / Е. Ю. Крысанов, Т. Б. Демидова, Б. И. Шефтель // Зоологический журнал. – 2009. – Т. 88. - №. 2. – С. 234-238.

- 19) Кубасова, И. Ю. Гормональные вещества как стимуляторы или ингибиторы роста опухолей в комбинации с цитостатиками / И. Ю. Кубасова, З. П. Софьина // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. - 1993. - Т. 4. - № 5. - С. 25 - 29.
- 20) Макоедов, А. Н. Кариология, биохимическая генетика и популяционная фенетика лососевидных рыб Сибири и Дальнего Востока: сравнительный аспект/ дис. ... доктора биологических наук: 03.00.10 / Макоедов Анатолий Николаевич. – Москва, 2000. – 50 с.
- 21) Махров, А. А. Зачем нужны триплоидные рыбы/ А. А. Махров// Рыбалка на Руси. – 2011. - №.4 – С. 66 – 69.
- 22) Мельниченко, Р. К. Биология размножения и особенности кариотипов видов рода *Pseudanodonta* (Mollusca, Bivalvia, Unionidae) фауны Украины / Р. К. Мельниченко, Л. М. Янович // *Vestnikzoologii*. – 2000. – №. 14. – С. 25-33.
- 23) Моргулис, И. И. Ранняя реакция организма млекопитающего на воздействие хлоридом кобальта/ дис. ... доктора биологических наук: 06.00.16, 03.00.02 / Моргулис Ирина Ильинична. – Красноярск, 2006. – 112 с.
- 24) Моргулис, И.И. Биологическая роль кобальта/ И. И. Моргулис, Р. Г. Хлебопрос// Красноярский научный центр СО РАН СибФУ. - Красноярск. - 2005.
- 25) Назаренко, С. А. Хромосомный анализ и его методы / С. А. Назаренко, Ю. С. Яковлева. – 2009.
- 26) Насибов, Ш. Н. Генетический потенциал дикой фауны в создании новых селекционных форм животных / Ш. Н. Насибов, В. А. Багиров, П. М. Кленовицкий, Б. С. Иолчиев, Н. А. Зиновьева, В. А. Воеводин, Ф. С. Амиршоев // Достижения науки и техники. – 2010. - №.8. – С. 59 – 62.
- 27) Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений/ З. П. Паушева. – Агропромиздат – Москва, 1988. — 271 с.
- 28) Пенкин, Н.А. Цитогенетические аспекты хронического воздействия

- мутагенных факторов на гидробионтов / дис. ... кандидат биологических наук: 03.00.18 / Пенкин Михаил Александрович. – Москва, 2008. – 142 с.
- 29) Петросян, Р. А. Динамика иммунобиологической реактивности организма крыс при экспериментальном трихинеллезе / Р. А. Петросян, С. О. Мовсесян, М. А. Никогосян, И. М. Одоевская, М. С. Панайотова – Пенчева, М. В. Воронин, Н. Б. Теренина, А. В. Демяшкевич // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2017. – №. 18. – С. 349 – 353.
- 30) Пикалова, Л. В. Применение цитогенетических методов исследования хромосом в радиологии / Л. В. Пикалова // Молекулярная биология. – 2007. – 2009. – С.160–168.
- 31) Праздников, Д. В. Сравнительная кариология бычковых рыб (Gobiidae) фауны России: эволюционный и таксономический аспект : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.16 / Праздников Денис Владимирович. - Москва – 2013. – 112 с.
- 32) Рябченко, Н.И. Адаптивный ответ в разных митотических циклах после облучения / Н. И. Рябченко, В. Я. Готлиб, А. М. Серебряный, О. В. Кудряшова, И. И. Пелевина, А. Н. Осипов, А. В. Алещенко, Л. П. Семенова, М. М. Антощина, О. В. Боева, Е. Ю. Лизунова // Цитология. – 2009. – Т. 51. - №.1. – С. 78 – 83.
- 33) Савилова, А. М. Сравнительное исследование экспрессии мРНК интерлейкина-2 и рецептора интерлейкина-2а в лимфоцитах, активированных ФГА и Кон А / А. М. Савилова, М. М. Чулкина, Л. П. Алексеев // Иммунология. – 2013. – Т. 34. - №. 2. – С. 76 – 80.
- 34) Сало, В. М. Применение безвременника и колхицина / В. М. Сало. - 2008.
- 35) Симаков, Ю. Г. Генетика: Учебно – методический комплекс/ Ю. Г. Симаков. – МГУТУ - Москва, 2012. – 147 с.
- 36) Сорочинский, Б. В. Антимитотические соединения как модификаторы лучевого поражения культивируемых клеток / Б. В.

- Сорочинский, А. И. Прохневский, Д. М. Гродзинский // Цитология и генетика. - 1994. – Т. 28. – №. 1. – С. 3
- 37) Таликина, М. Г. Влияние типичной магнитной бури на митоз зародышевых клеток и размерно-массовые показатели предличинок плотвы (*Rutilus rutilus* L.) / М. Г. Талакина, В. В. Крылов, Ю. Г. Изюмов, Ю. В. Чеботарева // Биология внутренних вод. – 2013. – №. 1. – С. 56.
- 38) Трофимов, В. А., Влияние холестерина на экспрессию генов раннего ответа и митотическую активность перитонеальных макрофагов / В. А. Трофимов, О. Н. Аксенова, А. В. Никулин, М. В. Ромашкина, Е. А. Иванова, А. М. Орешин // Казанский медицинский журнал. - 2009. - Т. 90. - №. 4. - С. 560 - 563.
- 39) Циркин, В. И. Перспективы изучения агглютинации эритроцитов, индуцированной лектинами, для диагностики преждевременных родов / В. И. Циркин, А. Ю. Анисимов, С. Л. Дмитриева, О. А. Братухина, С. В. Хлыбова, Е. Г. Шушканова, А. В. Марьяина, О. М. Безмельцева // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2017. – №. 1. – С. 83-104.
- 40) Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю. С. Ченцов – издательство «Академкнига» - Москва, 2004. – 495 с.
- 41) Кариотипы водных представителей [Электронный ресурс]: генетические ресурсы. – 2014. – Режим доступа: http://mail.nbfgr.res.in/Fish_Karyome/index.php
- 42) Boron, A. Chromosome study of swamp minnow *Eupallasellapercnurus* (Dybowski, 1916) from Poland / A. Boron, M. Jankun, J. Kuszniierz // Caryologia. – 1997. - Vol. 50. - №. 1. - P. 85 – 90.
- 43) Carmona, R. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens / R. Carmona, M. Garsila - Gallego, A. Sanz, A. Domezain, M. V. Ostos - Garrido // Journal of Fish Biology. - 2004. - Vol. 64. - №. 2. - P. 553 - 566.

- 44) Cataudella, S. The chromosomes of 11 species of Cyprinidae and one Cobitidae from Italy, with some remarks on the problem of polyploidy in the Cypriniformes / S. Cataudella, L. Sola, R. A. Muratori, E. Capanna // *Genetica*. – 1977. – Vol. 47, №. 3. – P. 161-171.
- 45) Dai, Y. Karyotype and evolution analysis of vulnerable fish *Onychostomalini* from China / Y. Dai // *Systems Biology (ISB)*, 2013 7th International Conference on. – IEEE, 2013. – P. 49-54.
- 46) Esmaeili, H. R. First karyological analysis of an endemic fish, zagros tooth-carp, *AphaniusVladykovi* Coad, 1988 (Actinopterygii: Cyprinodontidae) from Iran / H. R. Esmaeili, M. Ebrahimi, A. Teimori, T. Hojat Ansari // *Iranian Journal of Science & Technology*. – 2009. - Vol. 33. - №.4. – P. 349 – 354.
- 47) Evans, D.H. Osmotic and ionic regulation / D. H. Evans // *The Physiology of Fishes*. – 1993. - P. 315-341.
- 48) Ford, E. H. R. A colchicine, hypotonic citrate, air drying sequence for foetal mammalian chromosomes / E. H. R. Ford, D. H. M. Woollam // *Stain technology*. – 1963. – T. 38. – №. 5. – C. 271-274.
- 49) Fredga, K. Chromosome preparations in the field from mammals long after death / K. Fredga // *Stain technology*. – 1987. – T. 62. – №. 3. – C. 167-171.
- 50) Ganai, F. A., A karyological analysis of *Puntius conchoni* (Hamilton, 1822) (Pisces, Cyprinidae), a new cytotype from Dal Lake Srinagar Kashmir, Jammu and Kashmir (JK), India / F. A/ Ganai, A., A. R. Yousuf // *International Journal of Fisheries and Aquaculture*. – 2011. – Vol. 3. – №. 9. – P. 175-179.
- 51) Gas, M. Revue bibliographique sur caryologie des Teleosteens: Etude critique des methodes employees et des resultatsobtenus / M. Gas, // *Biology and medicine*. – 1970. – №. 1. – P. 54 – 81
- 52) Gold, J. R. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding / J. R. Gold, Y. C. Li, Y, N. S. Shipley, P. K. Powers // *Journal of Fish Biology*. – 1990. – Vol. 37. №. 4. – P. 563-575.
- 53) Greco, A. M. The effects of soft-water acclimation on gill structure in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* / A. M. Greco, J. C. Fenwick, S. F. Perry //

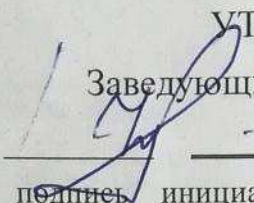
- Cell and tissue research. – 1996. – Vol. 285. – №. 1. – P. 75-82.
- 54) Kilic, D. Karyotype analysis of chub, *Squaliuscephalus*(Linnaeus, 1758)(Teleostei: Cyprinidae) from Karasu River, Erzurum, Turkey / D. Kilic, T. Sisman // Caspian Journal of Environmental Sciences. – 2016. – Vol. 14. – №. 2. – P. 95-103.
- 55) Kilic-Demirok, N. Karyotype of cyprinid fish *Alburnoidesbipunctatus* (Cyprinidae) from the Tigris River / N. Kilic-Demirok, E. Unlu // Folia biologica. – 2004. – Vol. 52. – P. 57-59.
- 56) Knytl, M. Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *Carassiuscarassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae) / M. Knytl, L. Kalous, P. Rab // Comparative Cytogenetics. – 2013. – Vol. 7. - №. 3. – P. 205 – 215.
- 57) Kovalev, K. V. The karyotype of the Amu Darya sturgeon, *Pseudoscaphirhynchuskaufmanni* (Actinopterygii: Acipenseriformes: Acipenseridae) / K. V. Kovalev, Kovalev, D. A. Balashov, A. L. Cherniak, E. B. Lebedeva, E. D. Vasil'eva // ActaIchthyologica et Piscatoria. – 2014. - Vol. 44. - №. 2. - P. 111–116.
- 58) Lee, G.–Y. Karyotypes of four species in genus *Moroco*(Pisces: Cyprinidae) from Korea and Japan / G.–Y. Lee [et al.] // Korean Journal of Limnology. – 1987. – Vol. 20, №. 1. – P. 49-60.
- 59) McCormick, Stephen D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish / Stephen D. McCormick // /American zoologist. – 2001. – Vol. 41. – №. 4. – P. 781-794.
- 60) Moenkhus, W. J. The development of the hybrids between *Fundulusheteroclitus* and *Menidianotata* with especial reference to the behavior of the maternal and paternal chromatin / W. J. Moenkhus // Developmental Dynamics. – 1904. – Vol. 3. – №. 1. – P. 29-64.
- 61) Molina, W. F. An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics / W. F. Molina // Chromosome Science. – 2001. – Vol. 5. – №. 3. – P. 149 - 152.

- 62) Nasri, M. First karyological analysis of smallmouth lotak, *Cyprinion kais* Heckel, 1843, an endemic Cyprinid fish from the Tigris–Euphrates Basin / M. Nasri, Y. Keivany, S. Dorafshan // Italian Journal of Zoology. – 2010. – Vol. 77. – №. 3. – P. 272-276.
- 63) Netto, M. R. C. B. A standard protocol for obtaining fish chromosomes under post-mortem conditions / M. R. C. B. Netto, E. Pauls, P. R. A. de Mello Affonso // Micron. – 2007. – Vol. 38. - №. 3. – P. 214-217.
- 64) Ozouf-Costaz, C. Fish cytogenetic techniques: Ray-Fin fishes and chondrichthyans / C. Ozouf-Costaz et al. – CRC Press, 2015. – P. 216.
- 65) Pereira, B. F., Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish / B. F Pereira, F. H. // Micron. – 2009. – Vol. 40. – №. 8. – P. 783-786.
- 66) Pourkazemi, M. Karyology study on Bleak (*Alburnusalburnus*) from the South Caspian Sea region / M. Pourkazemi, A. Khosravanizadeh, M. R. Nowruz Fashkhami // Caspian Journal of Environmental Sciences. – 2011. – Vol. 9. - №. 1. – P. 27-36.
- 67) Pukhtayevych, P. P. Modified Method of Metaphase Plates Obtaining for Polyploid Fish Genera *Carassius* and *Cobitis* Karyotyping (Actinopterygii, Cypriniformes) / P. P. Pukhtayevych, // Vestnik Zoologii. – 2014. – Vol. 48. – №. 4. – P. 371-376.
- 68) Rosecchi, E. Can life-history traits predict the fate of introduced species? A case study on two cyprinid fish in southern France / E. Rosecchi, F. Thomas, A. J. Crivelli // Freshwater Biology. – 2001. – Vol. 46. – №. 6. – P. 845-853.
- 69) Sember, A. Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation / A. Sember, J. Bohlen, V. Slechtova, M. Altmanova, R. Symonova, P. Rab // BMC evolutionary biology. – 2015. – Vol. 15. – №. 1. – P. 251.
- 70) Shao, C. W. Comparison of chromosome preparation methods for the different developmental stages of the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* /

C.W. Shao, P. F. Wu, X. L. Wang, Y. S. Tian, S. L. Chen // *Micron*. – 2010. – Vol. 41. – №. 1. – P. 47-50.

- 71) Singh, S. S. Karyotype Analysis of the New Catfish *Mystusngasep* (Siluriformes: Bagridae) from Manipur, India / S. S. Singh, Ch. Brajakishor Singh, G. Waikhom // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 2013. – №. 13. – P. 179-185.
- 72) Vickers, T. A. study of the intestinal epithelium of the goldfish *Carassiusauratus*: its normal structure, the dynamics of cell replacement, and the changes induced by salts of cobalt and manganese / T. A. Vickers // *Journal of Cell Science*. – 1962. – Vol. 3. – №. 61. – P. 93 - 110.
- 73) Weyts, F. A. A. Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes / F. A. A. Weyts, B. M. L. Verburg - van Kemenade, G. Flik, J. G. D. Lambert, S. E. WendelaarBonga // *Brain, behavior, and immunity*. – 1997. – Vol. 11. – №. 2. – P. 95 - 105.
- 74) Wong, Chris K. C. Chloride cell subtypes in the gill epithelium of Japanese eel *Anguilla japonica* / Chris K. C. Wong, D. K. O. Chan // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 1999. – Vol. 277. – №. 2. – P. 517-522.
- 75) Woznicki, P. A new in vivo method for increasing the mitotic index for teleost fish / P. Woznicki, M. Jankun, A. M. Wisniewska // *Caryologia*. – 2004. – Vol. 57. – №. 3. – P. 259 - 261.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра водных и наземных экосистем

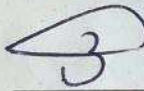
УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись / инициалы, фамилия
« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Оценка влияния фитогемагглютинаина и изменения солёности воды на число делящихся соматических клеток у рыб с низкой митотической активностью

Руководитель

 18.06.18

подпись, дата

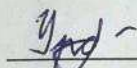
доцент, к.б.н

должность, учёная
степень

И. В. Зуев

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

В. Н. Урбанович

инициалы, фамилия

Красноярск 2018