

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ХОЛИНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ДЕЙСТВИИ НА ЛИЧИНОК *CHIRONOMUS PLUMOSUS* (DIPTERA) IN VIVO

© И. А. Федорова,¹ Н. В. Полуконова, Н. В. Петров

Саратовский государственный медицинский университет;

¹электронный адрес: irina-genet@rambler.ru

Морфометрический анализ изменения активности ядрышкового организатора (ЯО), колец Бальбиани (КБ) — КБ_B, КБ_{1G}, и КБ_{2G}, пуффа плеча В хромосомы I, компактности политенных хромосом *Chironomus plumosus* (Diptera) в остром периоде при раздельном и комбинированном действиях атропина и пилокарпина выявил подавляющий эффект смеси холинотропных препаратов. Индикатором токсичности служит угнетение активности ЯО при увеличении концентрации атропина в смеси препаратов.

Ключевые слова: цитогенетические эффекты, политенные хромосомы, м-холиноблокатор, м-холиномиметик, атропин, пилокарпин, *Chironomus plumosus*.

Принятые сокращения: КБ — кольцо Бальбиани (КБ_B — КБ плеча В хромосомы I, КБ_{1G} — КБ₁, КБ_{2G} — КБ₂), ПХ — политенные хромосомы, ЯО — ядрышковый организатор.

Холинотропные препараты пилокарпин и атропин являются алкалоидами с противоположным действием на вегетативную нервную систему и секрецию слюнных и других желез. М-холиномиметик пилокарпин стимулирует секреторную деятельность, а м-холиноблокатор атропин ее угнетает (Levin, 1992; Busch, Borda, 2007). В связи с широким применением в медицине нейротропных лекарственных препаратов, воздействующих на мускариновые холинореактивные системы, остается актуальным изучение их влияния на клеточном и субклеточном уровнях. Так, исследования рецепторной избирательности действия холинопозитивных и холинонегативных соединений на гидробионтах *Daphnia magna*, сопоставленные с результатами исследований, выполненных на крысах, позволили рекомендовать дафний в качестве альтернативного тест-объекта (Тонкопий и др., 1999; Подосиновичева и др., 2002). Анализировали молекулярные механизмы действия ненеуронального ацетилхолина на клетку и иммуотропные эффекты антагонистов мускариновых рецепторов в профилактике водоиммерсионного стресса у мышей (Нежинская и др., 2006, 2008б); выявлена ведущая роль холинергических механизмов в фармакологических эффектах подавления шоковой реакции (Нежинская и др., 2008а).

Индикатором воздействия на молекулярно-генетическом уровне являются изменения функциональной активности интерфазных хромосом эукариотических организмов (Тимошевский, Назаренко, 2005). Удобным модельным объектом служат политенные хромосомы (ПХ) клеток слюнных желез личинок двукрылых насекомых — хирономид (Жимулев, 1992, 1994; Кикнадзе и др., 1996; Петрова, Клишко, 2001). Наличие м-холинергической нейромедиации у Chironomidae (Beauvais et al., 1999; Turberg et al., 1999) делает ядерный аппарат клеток слюнных

желез, высокочувствительных к воздействию холинотропных препаратов, уникальным объектом для изучения их влияния на активность специфических участков политенных хромосом.

Эффекты пилокарпина на функциональную активность ПХ клеток слюнных желез хирономид исследовали начиная с 1960—1970-х годов (Clever, 1969; Veerman, 1973). К концу 1970-х годов было установлено, что пилокарпин вызывает увеличение функциональной активности ПХ слюнных желез и синтеза белкового секрета. Это обусловлено не прямым действием этого препарата на клетки слюнных желез, а индукцией рефрактерных клеток, усиливающих выведение секрета из железы и стимулирующих вследствие этого его синтез в клетках слюнных желез (Mähr et al., 1980). Цитогенетические эффекты атропина на ПХ хирономид изучены менее подробно.

Известно, что атропин и другие м-холиноблокаторы используют в качестве антидотов при отравлениях пестицидами из группы фосфорорганических соединений антихолинэстеразного типа действия и некоторых боевых отравляющих веществ (зарин, зоман), хотя сами способны вызывать отравление посредством блокады м-холинорецепторов (Крылов и др., 1999; Забродский и др., 2006). При развившейся холинергической блокаде прервать ее, воздействуя холиномиметиками, не удастся. Можно лишь ускорить деблокаду некоторых висцеральных органов, вызванную м-холиноблокаторами только непродолжительного действия (атропин, скополамин, амизил), с помощью холинопозитивных препаратов (Крылов и др., 1999). Цитогенетические эффекты пилокарпина при предварительной обработке атропином не были исследованы. Между тем установление закономерностей действия холинергически активных веществ позволит эффективно

Показатели функциональной активности политенных хромосом двукрылых насекомых

Индекс		Расчет индекса для <i>Chironomus plumosus</i>	Литературный источник
название	обозначение		
Индекс компактности хромосомы	CR ^a	Отношение абсолютной длины плеча E к ширине центромеры хромосомы III	Ильинская, 1984, 1990
Коэффициент активности ЯО	NOR ^a	Отношение максимального диаметра ядрышка к ширине интактного района 6 хромосомы IV	Stockert, 1990
Коэффициент активности КБ	BR _{1G} R ^a	Отношение максимального диаметра КБ ₁ к ширине интактного района 6 хромосомы IV	Лычев, 1968
	BR _{2G} R ^a	Отношение максимального диаметра КБ ₂ к ширине интактного района 6 хромосомы IV	
	BR _B R ^a	Отношение максимального диаметра КБ плеча В к ширине интактного района 17 того же плеча хромосомы I	
Коэффициент активности пуффа	P _B R ^a	Отношение максимального диаметра видоспецифичного пуффа 21 района к ширине интактного диска 21 плеча В хромосомы I	То же

^a Обозначения наши.

использовать возможности модуляции холинергических структур разных уровней организации.

Цель настоящей работы — сравнить цитогенетические эффекты пилокарпина и атропина в остром периоде при раздельном и комбинированном действии на личинок *Chironomus plumosus* in vivo.

Материал и методика

В качестве испытуемого объекта использовали личинок *Ch. plumosus* IV возраста и 7—8-й фазы зрелости, собранных в водоемах Саратовской обл. в первой декаде февраля 2008 г. Возраст и фазу личинок устанавливали по методике Ильинской и Иордан (1975). Всего исследовано 320 личинок, из которых 50 составили контрольную группу.

До начала экспериментов личинок 1 сут содержали в лабораторных условиях, в течение которых погибли личинки, травмированные при транспортировке. Эксперименты проводили в пластиковых емкостях объемом 250 мл при комнатной температуре в статических условиях, без субстрата (для того, чтобы избежать адсорбции препарата на частицах ила), в отстоянной водопроводной воде при pH = 7 (РД 52.24.635-2002).

Экспозиция влияния холинотропных препаратов на личинок составляла от 12 до 96 ч, что соответствовало острому периоду воздействия, поэтому кормление животных не осуществляли. Величины LC₅₀ для атропина и пилокарпина определяли методом пробит-анализа (Коросов, Калинин, 2003) и аналитическим экспресс-методом (Фруммин, 1991). В эксперименте использовали препаративную форму холинотропных препаратов — сульфат атропина (Московский эндокринный завод, Россия) и гидрхлорид пилокарпина (Ферейн, Россия).

Личинок помещали в 4 емкости: с чистой водой (контроль, раствор 1), в раствор атропина в концентрации 0.13 мг/мл (раствор 2), в раствор атропина в концентрации 0.4 мг/мл (раствор 3) и в раствор пилокарпина в концентрации 0.67 мг/мл (раствор 4). Через 24 ч часть личинок

оставалась в растворах 1—4, часть личинок из растворов 2 и 3 помещали в новую емкость с раствором 4, часть личинок находилась в емкостях с растворами 2 и 3, к которым был добавлен раствор 4. Личинок фиксировали через 24, 48 и 72 ч как после их перемещения из раствора атропина в раствор пилокарпина, так и при добавлении раствора пилокарпина к атропину. Параллельно фиксировали контрольных личинок и личинок из растворов атропина и пилокарпина через 12, 24, 48, 72 и 96 ч. При каждой экспозиции и концентрации исследовали 10 личинок (по 10 клеток слюнных желез от каждой личинки). Концентрации препаратов при постановке эксперимента определяли как доли от LC₅₀ — полулетальной концентрации исследуемого вещества, при действии которой наблюдалась гибель 50 % подопытных особей. Выбор концентраций проводили с учетом того, что атропин как блокатор м-холинорецепторов оказывает более сильное воздействие по сравнению с пилокарпином, поэтому в эксперименте использовали концентрации атропина, составляющие 1/15 и 1/5 доли от LC₅₀, и более высокую концентрацию пилокарпина — 1/3 LC₅₀.

Личинок фиксировали в спирт-уксусной смеси (3 : 1). Препараты ПХ готовили по этил-орсеиновой методике (Шобанов, Демин, 1988). Временные препараты ПХ анализировали с помощью светового микроскопа «Люмипам» при увеличении 7×60. Микрофотографии хромосом получали при помощи микрофотоаппарата к микроскопу Axiostar.

В качестве критериев функциональной активности ПХ *Ch. plumosus* (2n = 8, цитоккомплекс thummi: АВ, CD, EF и G) использовали индексы активности ядрышкового организатора (ЯО) отдела 2 плеча G хромосомы IV, трех колец Бальбиани (КБ) — отдела 16 плеча В хромосомы I, отделов 7 и 8 плеча G и видоспецифичного пуффа отдела 21 плеча В (табл. 1), а также компактности ПХ (Ильинская, 1990; Stockert, 1990). Экспериментальные данные нормировали на контроль: значения индексов в контроле были приняты за единицу. Функциональную активность ПХ *Ch. plumosus* по степени их компактности оценивали на основе шкалы морфотипов ПХ (Ильинская, 1989).

Таблица 2

Значения вероятности статистически достоверных различий при раздельном и комбинированном воздействиях холинотропных препаратов

Индекс	Время, ч	Раствор 2	Перемещение в раствор 4	Добавление раствора 4	Раствор 3	Перемещение в раствор 4	Добавление раствора 4	Раствор 4
К/Е	12	0.15	—	—	0.02	—	—	<0.01
	24	0.97	—	—	0.02	—	—	0.11
	48	<0.01	0.03	0.36	0.12	0.44	0.60	0.05
	72	<0.01	<0.01	<0.01	0.46	<0.01	<0.01	<0.01
	96	0.24	0.02	0.07	<0.01	<0.01	0.54	—
Кп	12	0.09	—	—	<0.01	—	—	<0.01
	24	0.11	—	—	0.97	—	—	0.62
	48	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	72	0.70	0.05	0.64	<0.01	0.15	<0.01	0.23
	96	<0.01	0.83	0.56	<0.01	0.71	0.04	—
BRR _B	12	0.05	—	—	<0.01	—	—	<0.01
	24	0.01	—	—	0.37	—	—	0.08
	48	<0.01	0.71	<0.01	0.33	0.21	<0.01	0.76
	72	0.33	0.71	0.01	<0.01	0.28	0.73	<0.01
	96	0.30	0.31	0.12	<0.01	0.76	0.95	—
BRR _{1G}	12	<0.01	—	—	<0.01	—	—	<0.01
	24	0.86	—	—	<0.01	—	—	0.84
	48	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	72	0.04	0.43	0.80	0.19	0.28	<0.01	0.66
	96	<0.01	<0.01	0.03	0.03	<0.01	0.18	—
BRR _{2G}	12	0.58	—	—	0.52	—	—	<0.01
	24	<0.01	—	—	0.03	—	—	0.17
	48	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	72	0.11	0.25	0.60	0.01	0.05	0.21	0.80
	96	0.18	0.28	0.33	<0.01	<0.01	0.04	—
SSP _B	12	<0.01	—	—	0.04	—	—	0.25
	24	0.58	—	—	0.31	—	—	<0.01
	48	0.56	0.08	<0.01	0.08	0.04	0.05	0.01
	72	0.30	0.47	0.02	0.88	0.25	0.28	<0.01
	96	0.20	0.74	0.55	<0.01	0.67	<0.01	—

Примечание. Растворы: 2 — атропин в концентрации 0.13 мг/мл, 3 — атропин в концентрации 0.4 мг/мл, 4 — пилокарпин в концентрации 0.67 мг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили в среде специализированных пакетов Excel и Statistica 6. Для характеристики выборок использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости различий между значениями морфометрических показателей в контрольной выборке и при воздействии разных концентраций лекарственных препаратов использовали однофакторный дисперсионный анализ при $P < 0.05$ (табл. 2).

Результаты

Функциональная активность ПХ по индексу компактности. При содержании личинок в растворе 2 активность ПХ достоверно возрастала через 48 ч, снижалась через 72 ч; при влиянии раствора 3 — повышалась через 12 и

96 ч и была подавлена через 24 ч экспозиции. При действии пилокарпина в концентрации 0.67 мг/мл (раствор 4) отмечалось повышение активности через 12, 48 и 72 ч экспозиции (рис. 1).

Цитогенетические эффекты холинотропных препаратов при перемещении личинок из раствора атропина в пилокарпин и добавлении пилокарпина в атропин неодинаковые. Так, после перемещения личинок из раствора 2 в раствор 4 через 24 ч, так же как и при содержании личинок только в атропине (растворы 2 и 3), активность ПХ достоверно повышалась, т. е. воздействие пилокарпина никак не повлияло на изменение активности ПХ. Снижение функциональной активности отмечалось с 48 до 72 ч после перемещения личинок из атропина разных концентраций (растворы 2 и 3) в раствор 4. Через 48 ч после добавления раствора 4 в атропин (растворы 2 и 3) наблюдалось достоверное снижение функциональной активности

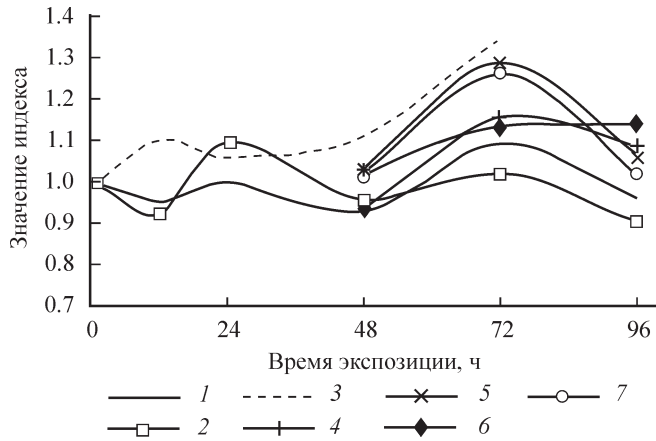


Рис. 1. Изменение активности политенных хромосом (ПХ) по индексу компактности при воздействии холинотропных препаратов *in vivo*.

Обозначения к рис. 1—6: 1 — раствор атропина 0.13 мг/мл, 2 — раствор атропина 0.4 мг/мл, 3 — раствор пилокарпина 0.67 мг/мл, 4 — перемещение из раствора атропина 0.13 мг/мл в раствор пилокарпина 0.67 мг/мл, 5 — добавление к раствору атропина 0.13 мг/мл раствора пилокарпина 0.67 мг/мл, 6 — перемещение из раствора атропина 0.4 мг/мл в раствор пилокарпина 0.67 мг/мл, 7 — добавление к раствору атропина 0.4 мг/мл раствора пилокарпина 0.67 мг/мл. Изменение функциональной активности обратно пропорционально изменению значения индекса компактности ПХ — при снижении значения индекса компактности функциональная активность хромосом возрастает, и наоборот.

ПХ, в то время как при содержании личинок в атропине активность ПХ достоверно возросла (рис. 1).

Активность ЯО. При содержании личинок в растворе 2 активность ЯО достоверно снижалась через 48 и 96 ч. Под влиянием раствора 3 активность снижалась с 48 до 96 ч. При действии раствора 4 отмечалось достоверное снижение активности через 12 и 48 ч (рис. 2).

Через 24 ч после перемещения в раствор 4 при предварительной обработке атропином (растворы 2 и 3) наблюдалось снижение активности, в то время как при содержании личинок только в атропине активность ЯО также снижалась, т. е. воздействие пилокарпина никак не повлияло на изменение активности ПХ. Через 48 ч активность повышалась и через 72 ч восстанавливалась до состояния в контроле. Через 24 ч после добавления раствора 4 к раствору 2 наблюдалось достоверное снижение активности ЯО, как и в атропине. При добавлении раствора 4 к раствору 3 наблюдалось достоверное снижение по сравнению с контролем активности ЯО при всех экспозициях (рис. 2).

Активность КБ_В. При содержании личинок в растворе 2 активность снижалась через 24 и 48 ч, кратковременно повышалась через 12 ч. Под влиянием раствора 3 активность также снижалась через 72 и 96 ч и кратковременно повышалась через 12 ч экспозиции. При действии раствора 4 отмечалось достоверное снижение функциональной активности через 72 ч; при 12 ч экспозиции активность повышалась (рис. 3).

При перемещении личинок в раствор 4 из растворов 2 и 3 достоверных различий активности КБ_В по сравнению с контролем не наблюдалось. С 24 до 48 ч после добавления раствора 4 к раствору 2 функциональная активность снижалась, в то время как в атропине активность повышалась. Через 24 ч после добавления раствора 4 к раствору 3 активность КБ_В достоверно снижалась, в то время как в атропине достоверных различий с контролем не наблюдалось (рис. 3).

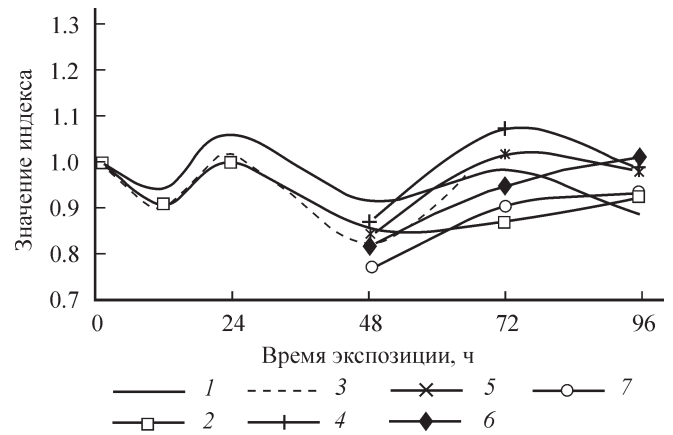


Рис. 2. Изменение активности ядрышкового организатора при воздействии холинотропных препаратов *in vivo*.

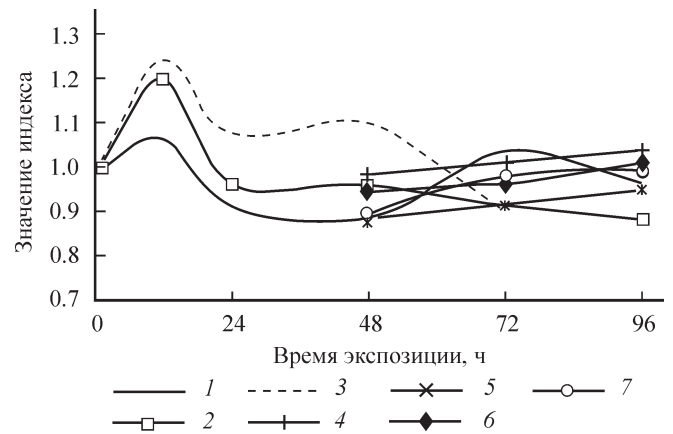


Рис. 3. Изменение активности КБ_В при воздействии холинотропных препаратов *in vivo*.

Активность КБ_Г. При содержании личинок в растворе 2 активность достоверно снижалась через 12 ч и с 48 до 96 ч. Под влиянием раствора 3 активность также была снижена с 12 до 48 ч и через 96 ч экспозиции. И при действии раствора 4 также отмечалось достоверное снижение активности КБ_Г через 12 и 48 ч экспозиции (рис. 4).

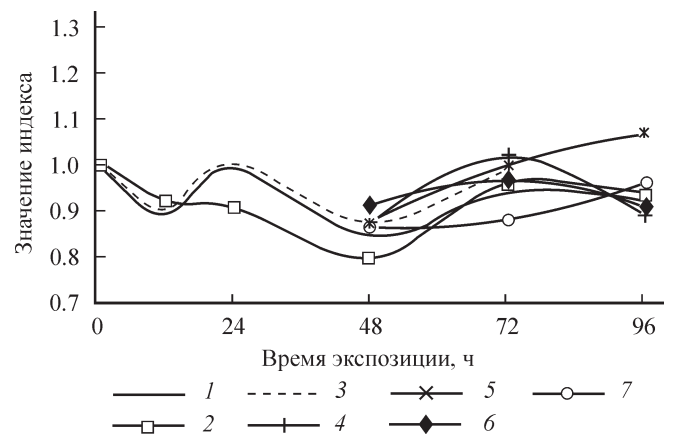


Рис. 4. Изменение активности КБ_Г при воздействии холинотропных препаратов *in vivo*.

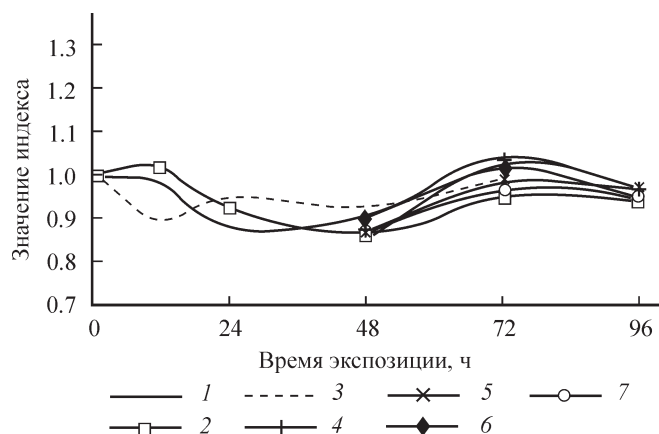


Рис. 5. Изменение активности $КБ_{2G}$ при воздействии холинотропных препаратов *in vivo*.

Через 24 и 72 ч экспозиции после перемещения личинок из атропина (растворы 2 и 3) в раствор 4 отмечалось достоверное снижение активности $КБ_{1G}$, в то время как только в атропине функциональная активность также снижалась. Через 24 ч после добавления раствора 4 к раствору 2 активность участка снижалась при снижении ее и в атропине, а через 72 ч повышалась. При добавлении раствора 4 к раствору 3 наблюдалось достоверное снижение активности $КБ_{1G}$ с 24 до 48 ч, в то время как только в атропине функциональная активность также снижалась (рис. 4).

Активность $КБ_{2G}$. При содержании личинок в растворе 2 активность достоверно снижалась с 24 до 48 ч, под влиянием раствора 3 — при всех экспозициях, кроме 12 ч. При воздействии раствора 4 отмечалось снижение активности $КБ_{2G}$ через 12 и 48 ч экспозиции (рис. 5).

Через 24 ч после перемещения личинок в раствор 4 после предварительной обработки атропином (растворы 2 и 3) функциональная активность снижалась на фоне снижения и в атропине. Через 24 ч после добавления раствора 4 к раствору 2 и через 24 и 72 ч после добавления раствора 4 к раствору 3 активность $КБ_{2G}$ снижалась, как и в атропине (рис. 5).

Активность пуффа плеча В. При содержании личинок в растворе 2 активность пуффа достоверно повышалась через 12 ч, под влиянием раствора 3 функциональная активность также повышалась через 12 ч и снижалась

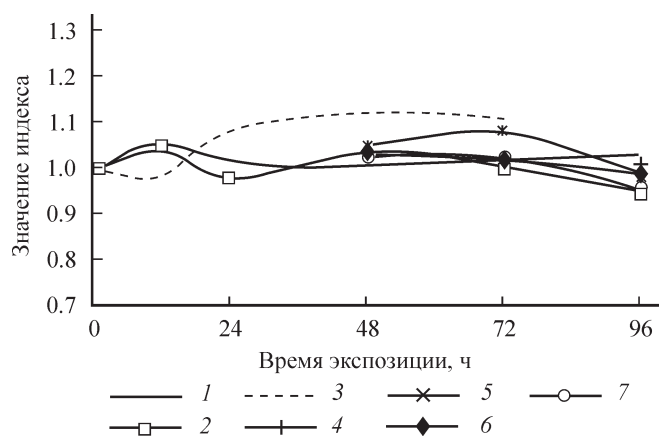


Рис. 6. Изменение активности пуффа плеча В при воздействии холинотропных препаратов *in vivo*.

через 96 ч экспозиции. При действии раствора 4 активность повышалась с 24 до 72 ч (рис. 6).

Через 24 ч после перемещения личинок в раствор 4 после предварительной обработки раствором 2 активность пуффа достоверно повышалась, в то время как в атропине достоверных различий функциональной активности с контролем не обнаружено. С 24 до 48 ч после добавления раствора 4 к раствору 2 отмечалось достоверное повышение активности. Через 24 ч после добавления раствора 4 к раствору 3 активность пуффа также повышалась, в то время как в атропине достоверных различий с контролем не наблюдалось; через 72 ч активность достоверно снижалась (рис. 6).

Обсуждение

Раздельное влияние атропина и пилокарпина. При действии атропина (растворы 2 и 3) отмечалась разбалансировка функциональной активности ПХ по индексу компактности, а при действии пилокарпина активность возрастала.

Известно, что ответная реакция ЯО на действие стрессовых факторов специфична и служит индикатором биологической активности на клеточном и субклеточном уровнях, ядрышко отвечает за поддержание гомеостаза в клетке и является сенсором многих стрессовых воздействий, а нарушение его функций приводит к апоптозу и гибели клеток (Зацепина, 2007). Нами установлено, что функциональная активность ЯО под действием как атропина, так и пилокарпина в целом снижалась. Угнетение работы этого активного участка под действием пилокарпина, не соответствующее характеру его влияния на ЯО, служит критерием токсичности пилокарпина на субклеточном уровне.

При анализе изменений активности $КБ_V$ и пуффа плеча В в ответ на действие атропина отмечалось закономерное ее повышение через 12 ч экспозиции, не адекватное фармакологическим особенностям м-холиноблокатора и, по-видимому, свидетельствующее о включении кратковременных механизмов гиперкомпенсации в ответ на стрессовое воздействие. Снижение активности $КБ$ при влиянии пилокарпина, также не соответствующее фармакологическим свойствам этого препарата, послужило критерием его токсического действия. Повышение активности при 12 ч экспозиции пилокарпином свидетельствовало о включении механизмов восполнения секрета после его выведения под действием препарата, стимулирующего секрецию железы.

Реакция $КБ_{1G}$ на действие атропина в целом вполне адекватна его фармакологическим особенностям. Снижение активности через 12 и 48 ч экспозиции при воздействии пилокарпина позволяет говорить о разбалансировке функций и также может служить критерием его токсического действия. Изменения $КБ_{2G}$ при влиянии холинотропных препаратов в целом коррелируют с изменениями $КБ_{1G}$.

Комбинированное влияние атропина и пилокарпина. Как было показано ранее (Левин, Высотский, 1949; Levin, 1992), при одновременном воздействии пилокарпина и атропина на слюнные железы различных биологических объектов сначала наступает холиномиметический, а затем типичный холиноблокирующий эффект. Такая реакция, возможно, обусловлена различиями этих препаратов по химической структуре и характеру

межмолекулярного взаимодействия с аминокислотами в составе м-холинорецепторов (Samarский, 1996).

Пилокарпин как агонист м-холинорецепторов раньше связывается с ними, а антагонистические свойства атропина проявляются позже. Проведенный нами анализ функциональной активности ПХ клеток слюнных желез подтверждает такую закономерность и на субклеточном уровне. Повышение функциональной активности ПХ по индексу компактности через 24 ч при перемещении личинок в раствор пилокарпина (4) после предварительной обработки атропином (раствор 2) может свидетельствовать о включении кратковременных механизмов клеточной адаптации в ответ на стрессовое воздействие. Снижение функциональной активности ПХ по индексу компактности в последующие 2 сут при предварительной обработке атропином (растворы 2 и 3) объясняется тем, что краткосрочного толчка для сохранения гомеостаза было недостаточно и компенсаторные механизмы истощились. Выявленный нами характер изменений значений индекса компактности позволяет говорить о чувствительности этого показателя при стрессовом воздействии.

О снижении компенсаторных реакций свидетельствует также подавление активности КБ_{1G} через 24 и 72 ч и активности КБ_{2G} через 24 ч после перемещения из атропина (растворы 2 и 3) в раствор пилокарпина (4). Кроме того, на основе динамики работы ЯО этот показатель отмечен нами как устойчивый при стрессовом воздействии. Так, после кратковременного снижения активности ЯО через 24 ч равновесие в работе активного участка восстанавливается через 48—72 ч при перемещении из раствора 3 в раствор 4.

Под влиянием пилокарпина секрет из слюнной железы полностью выводится и вслед за этим увеличивается активность КБ и пуффов, ответственных за его синтез, что приводит к активации секреторной деятельности в клетках слюнных желез (Валева, 1975; Busch, Borda, 2007). Повышение активности КБ_{1G} через 72 ч и пуффа плеча В с 24 до 48 ч после перемещения из раствора 3 в раствор 4 происходит, по-видимому, для восполнения секрета, выведенного при перемещении в раствор стимулирующего секреторную деятельность пилокарпина.

Действие смеси холинотропных препаратов. О токсическом действии смеси атропина и пилокарпина свидетельствует снижение функциональной активности ПХ по индексу компактности через 48 ч, активности КБ_B при всех экспозициях, активности КБ_{1G} и КБ_{2G} через 24 ч при добавлении раствора 4 к раствору 2 и функциональной активности ПХ по индексу компактности через 48 ч, а также снижение функциональной активности КБ_B и КБ_{2G} через 24 ч, активности КБ_{1G} с 24 до 48 ч; пуффа плеча В через 72 ч при добавлении раствора 4 к раствору 3.

Ядрышко отвечает за поддержание гомеостаза в клетке и является сенсором многих стрессовых воздействий, а нарушение его функций приводит к апоптозу и гибели клеток (Зацепина, 2007). Снижение активности ЯО при добавлении раствора 4 к раствору 3 при всех экспозициях свидетельствует о чувствительности этого показателя к действию смеси холинотропных препаратов с более высокой концентрацией атропина, способной нарушить и подавить работу ЯО.

С увеличением концентрации атропина укорачивается начальная пилокарпиновая и удлиняется последующая атропиновая стадия действия данной смеси (Левин, Высотский, 1949), что объясняет значительный подавляю-

щий функциональную активность ПХ эффект смеси холинотропных препаратов с более высокой концентрацией атропина. Неоднозначная реакция активных участков ПХ обусловлена, с одной стороны, их различной чувствительностью, а с другой — различной функциональной ролью в клетке. В целом можно сделать вывод о подавляющем функциональную активность ПХ эффекте холинотропных препаратов при добавлении раствора пилокарпина к атропину. Индикатором токсичности служит угнетение активности ЯО при увеличении доли холиноблокатора в смеси препаратов.

Список литературы

- Валева Ф. С. 1975. Влияние пилокарпина на пуффинг политенных хромосом слюнных желез *Chironomus thummi*. Цитология. 17 (9) : 1032—1036.
- Жимулев И. Ф. 1992. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука. 480 с.
- Жимулев И. Ф. 1994. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука. 565 с.
- Забродский П. Ф., Мандыч В. Г., Германчук В. Г. 2006. Иммуностимулирующие свойства полиоксидония при остром отравлении антихолинэстеразными токсичными химикатами. Эксперим. клинич. фармакол. 69 (6) : 37—39.
- Зацепина О. В. 2007. Современные представления о свойствах и функциях ядрышка: ядрышко как мишень стрессовых воздействий на клетки. Цитология. 53 (9) : 748—749.
- Ильинская Н. Б. 1984. Характеристика политенных хромосом различной степени компактности у личинок природной популяции хирономуса. Цитология. 26 (5) : 543—551.
- Ильинская Н. Б. 1989. Морфологическая изменчивость политенных хромосом личинок хирономид в естественных условиях обитания: Автореф. докт. дис. Л. 38 с.
- Ильинская Н. Б. 1990. Согласованность изменений компактности политенных хромосом и их плеч в клетках слюнных желез при акклиматизации личинок мотыля к различным температурам. Цитология. 32 (10) : 993—1001.
- Ильинская Н. Б., Иордан М. С. 1975. Методика определения стадии физиологической зрелости личинок хирономид IV возраста по структуре и величине зародышевых дисков. В кн.: Матер. 1-го (IX) заседания рабочей группы по проекту № 18 «Вид и его продуктивность в ареале». Вильнюс. 17—22.
- Кикнадзе И. И., Истомина А. Г., Гундерина Л. И., Салова Т. А., Айманова К. Г., Саввинов Д. Д. 1996. Кариофонды хирономид криолитозоны Якутии: триба Chironomini. Новосибирск: Наука. 166 с.
- Коросов А. В., Калинин Н. М. 2003. Количественные методы экологической токсикологии. Петрозаводск: ПетрГУ, КНЦ. 56 с.
- Крылов С. С., Ливанов Г. А., Петров А. Н., Семенов Е. В., Спринц А. М., Бучко В. М. 1999. Клиническая токсикология лекарственных средств. Холинотропные препараты. СПб.: Лань. 160 с.
- Левин С. Л., Высотский Н. Н. 1949. Об извращении порядка действия холинергических антагонистов на денервированную околушную железу человека. Цитология. 12 (4) : 55—58.
- Лычев В. А. 1968. Изучение величины и распределения пуффов *Drosophila melanogaster* в норме и при влиянии инбридинга и облучения: Автореф. канд. дис. Обнинск. 22 с.
- Нежинская Г. И., Владыкин А. Л., Сапронов Н. С. 2008а. Эффекты модуляции холинергической системы при воспалении. Эксперим. клинич. фармакол. 71 (2) : 46—48.
- Нежинская Г. И., Владыкин А. Л., Сапронов Н. С. 2008б. Нейрональные эффекты мускаринового антагониста в профилаксии стресса. Эксперим. клинич. фармакол. 71 (3) : 65—69.
- Нежинская Г. И., Лосев Н. А., Сапронов Н. С. 2006. Холинергическая система лимфоцитов. Эксперим. клинич. фармакол. 69 (6) : 63—67.

Петрова Н. А., Клишко О. К. 2001. К вопросу об индивидуальной изменчивости кариотипа *Chironomus plumosus*: нетипичные пуффы у личинки из природной популяции Читинской обл. Цитология. 43 (2) : 172—177.

Подосиновикова Н. П., Космачев А. Б., Тонкопий В. Д., Загребин А. О., Евдокимова Е. А., Малов А. М., Петров В. В., Долго-Сабуров В. Б. 2002. *Daphnia magna* Straus как объект при исследовании препаратов холинэргического типа действия. Эксперим. клинич. фармакол. 65 (1) : 73—74.

РД 52.24.635-2002. Методические указания. Проверка наблюдений по оценке уровня токсического загрязнения донных отложений на основе биотестирования. Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем. М.: Росгидромет. 15 с.

Тимошевский В. А., Назаренко С. А. 2005. Интерфазная цитогенетика в оценке геномных мутаций в соматических клетках. Генетика. 41 (1) : 5—16.

Тонкопий В. Д., Космачев А. Б., Загребин А. О., Филько О. А. 1999. Возможность использования *Daphnia magna* в качестве альтернативного тест-объекта для оценки рецепторной избирательности холинотропных веществ. Эксперим. клинич. фармакол. 62 (6) : 23—25.

Фруммин Г. Т. 1991. Экспресс-метод определения эффективных и смертельных доз (концентраций). Химико-фармацевтический журн. 25 (6) : 15—18.

Шобанов Н. А., Демин С. Ю. 1988. *Chironomus agilis* — новый вид из группы *plumosus* (Chironomidae, Diptera). Зоол. журн. 67 (10) : 1489—1497.

Beauvais S. L., Atchison G. J., Stenback J. Z., Crumpton W. G. 1999. Use of cholinesterase activity to monitor exposure of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) to a pesticide mixture in hypoxic wetland mesocosms. Hydrobiologia. 416 : 163—170.

Beerman W. 1973. Directed changes in the pattern of Balbiani Ring puffing in *Chironomus*: effects of a sugar treatment Chromosoma. 41 : 297—326.

Busch L., Borda E. 2007. Signaling pathways involved in pilocarpine-induced mucin secretion in rat submandibular glands. Life Sci. 80 : 842—851.

Clever U., Bultmann H., Darrow J. M. 1969. The immediacy of genomic control in polytene cells. In: Problems in biology: RNA in development. Salt Lake City: Univ. of Utah Press. 403—423.

Levin S. L. 1992. Salivatory responses to classical and nontraditional parasympatholytic agents in human subjects: critical comments. J. Clin. Pharmacol. 32 : 1013—1022.

Mähr R., Meyer B., Danholt B., Eppenberger H. M. 1980. Activation of Balbiani Ring genes in *Chironomus tentans* after a pilocarpine-induced depletion of the secretory products from the salivary gland lumen. Develop. Biol. 80 : 409—418.

Samarskii V. A. 1996. Donor-acceptor interactions of pilocarpine and atropine with amino acids. Pharmaceutical Chem. J. 30 : 5—6.

Stockert J. C. 1990. The normalized Balbiani size as a quantitative parameter for transcription activity in polytene chromosomes. Biol. Zbl. 109 : 139—146.

Turberg A., Schröder I., Wegener S., Londershausen M. 1999. Presence of muscarinic acetylcholine receptors in the cattle tick *Boophilus microplus* and in epithelial tissue culture cells of *Chironomus tentans*. Pesticide Sci. 48 : 389—398.

Поступила 30 III 2009

CYTOGENETIC EFFECTS OF CHOLINOTROPIC PREPARATIONS MIXTURE ON *CHIRONOMUS PLUMOSUS* (DIPTERA) LARVAE *IN VIVO*

I. A. Fyodorova,¹ N. V. Polukonova, N. V. Petrov

Saratov State Medical University; ¹e-mail: irina-genet@rambler.ru

Morphometric analysis of changes in nucleolar organizer (NO), Balbiani rings (BR) — BR_B, BR_{1G}, BR_{2G} and chromosome I arm B puff activities, and in chromosome compactness of *Chironomus plumosus* (Diptera) polytene chromosomes was carried out in acute period under separate and combined influence of atropine and pilocarpine. Suppression effect of cholinotropic preparations mixture was revealed. Suppression of NO activity with atropine concentration increase in the mixture served as criterion of toxicity.

К е у w o r d s: cytogenetic effects, polytene chromosomes, m-cholinoblocker, m-cholinomimetic, atropine, pilocarpine, *Chironomus plumosus*.