Rocz. Nauk. Zoot., T. 40, z. 1 (2013) 45–53

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ УКРАИНСКИХ КАРПОВ

Игорь Грициняк, Юлия Глушко, Сергей Тарасюк

Институт рыбного хозяйства НААН,
ул. Обуховская, 135, 03164, Киев, Украина
tarasjuk@ukr.net, niko-yulia@mail.ru

Выполнен сравнительный анализ частот цитогенетических показателей (эритроцитов и лимфоцитов с микроядрами, двуядерных лимфоцитов, аппоптоза) в клетках периферической крови карпов украинской рамчатой и чешуйчатой пород ОАО "Горный Тикич" и СГЦР "Подилля" (Украина). Показана возрастная динамика уровня цитогенетических показателей трех возрастных групп карпов СГЦР "Подилля". Установлено, что все возрастные группы карпов рамчатой породы характеризуются высшим уровнем цитогенетических нарушений сравнительно с чешуйчатыми карпами.

Развитие методов генетического мониторинга племенных ресурсов карпа дает возможность оценить влияние генотоксических факторов окружающей среды на их генетическую структуру. Снизить негативное влияние таких факторов возможно путем внедрения в рыбоводную практику экспресс-методов оценки и контроля стабильности генетического аппарата рыб в зависимости от их породной принадлежности, возраста и экологических условий разведения. Для оценки уровня дестабилизации хромосомного аппарата рыб используют микроядерный тест в эритроцитах и лимфоцитах периферической крови (Ahmad и Salehl, 2010). Преимущества микроядерного теста для скрининга мутагенных эффектов водной среды изучены на таких гемопоэтических системах рыб как: периферическая кровь, жаберные дуги, селезенка, печень, спинной мозг, тимус (Есауленко и Косякова, 2003; Andrade и др., 2004).

Кроветворная система рыб очень чувствительна к изменениям состояния окружающей среды, поэтому микроядерный тест в клетках периферической крови позволяет оценить уровень повреждений генетического материала у конкретной особи и популяции в целом в результате суммарного действия разных токсикантов (Ильинских и др., 1992). Хроническое действие генотоксинов на организмы рыб приводит к нарушению цитогенетической стабильности, накоплению хромосомных аберраций и геномных мутаций в клетках организмов, и как

результат, снижения их жизнеспособности. Развитие методов биологического мониторинга дает возможность определить степень загрязнения водоема и дать быстрый ответ о физиологическом состоянии рыб при низких концентрациях мутагенов прямого действия (Ahmad и Salehl, 2010).

С целью анализа зависимости уровня цитогенетических показателей от породной принадлежности, возраста рыб и условий разведения, используя микроядерный тест, проведены исследования карпов украинской рамчатой и чешуйчатой пород.

Материалы и методы

Исследования выполняли на репрезентативной выборке карпа СГЦР "Подилля" Хмельницкой обл. и ОАО "Горный Тикич" Черкасской обл. В СГЦР "Подилля" отбирали годовиков, двухгодовиков, трехгодовиков карпов украинской рамчатой и чешуйчатой пород по 15 особей в каждой группе. У рыб с хвостовой вены стерильным шприцом отбирали несколько капель периферической крови. На предметные стекла наносили две капли физиологического раствора (0,6% NaCl), одну каплю крови и готовили мазки. Фиксировали препараты метиловым спиртом и красили по методу Романовського стандартным раствором Гимза. Для анализа клеток использовали бинокулярный микроскоп "Primo Star Zeiss" с увеличением в 1000 раз. В мазках крови подсчитывали частоту эритроцитов с микроядрами (ЭМЯ) не меньше чем в 3000 клеток, одноядерных лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ), двуядерных лимфоцитов (ДЛ) и апоптозов (АП) не меньше чем в 1000 клеток (Давыдов и др., 2006). Полученные данные выражали в промилле (‰). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента (ts) (Плохинский, 1970).

Результаты

Клетки периферической крови рыб характеризируются высокой чувствительностью к действию генотоксинов. В эритроцитах периферической крови карпа, часто возникают микроядра, что может отображать неблагоприятное токсикологическое состояние среди обитания представителей аквакультуры. Еще одним важным этапом цитодифференциации клеток многоклеточных организмов является апоптоз, который в организме рыб играет чрезвычайно важную роль в поддержке клеточного гомеостаза, обеспечении развития и функционирования иммунной системы (Ярилин, 2003). На основе микроядерного теста и анализа количества апоптических клеток была проведена оценка породоспецифических особенностей уровня цитогенетических показателей двух груп карпа украинской рамчатой и чешуйчатой пород ОАО "Горный Тикич". Результаты подсчета клеток с цитогенетическими нарушениями в двух группах карпа приведены на рис. 1.

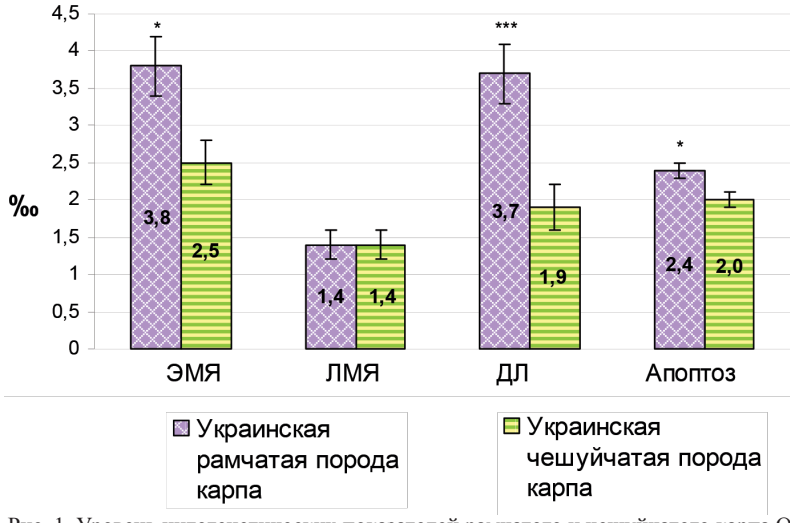


Рис. 1. Уровень цитогенетических показателей рамчатого и чешуйчатого карпа ОАО „Горный Тикич”

Fig. 1. Level of cytogenetic indicators of framed and scaled carp from OAO “Girsky Tikych”

Меньшие значения частот эритроцитов с микроядрами (2,5±0,3‰), двуядерных лимфоцитов (1,9±0,3‰) и апоптозов (2,0±0,1‰) выявлено в группе чешуйчатого карпа. Частоты лимфоцитов с микроядрами в двух группах карпов находились на одном уровне (1,4±0,2 ‰). Статистически достоверные отличия между группами чешуйчатых и рамчатых карпов наблюдали за частотами эритроцитов с микроядрами ($P<0,05$; $t_{st} = 2,1$), двуядерных лимфоцитов ($P<0,001$; $t_{st} = 3,7$) и апоптозов ($P<0,05$; $t_{st} = 2,1$).

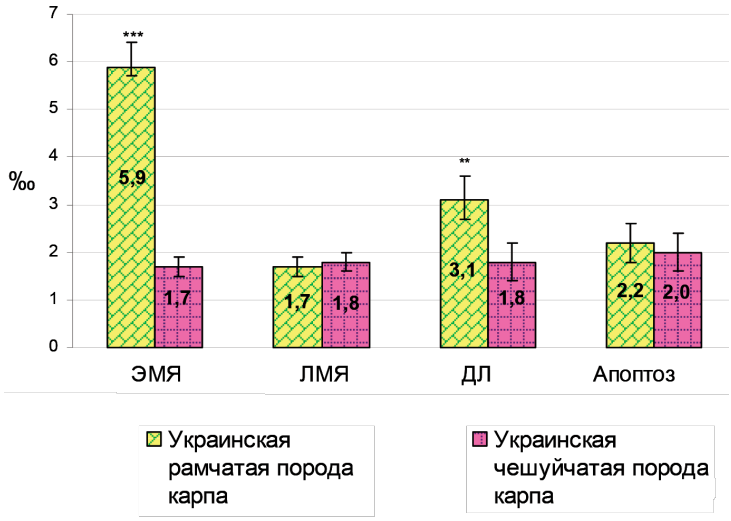


Рис. 2. Уровень цитогенетических показателей рамчатого и чешуйчатого карпа СГЦР „Подилля”

Fig. 2. Level of cytogenetic indicators of framed and scaled carp from SGCB “Podillya”

С целью объективной оценки породоспецифических особенностей уровня цитогенетических показателей в клетках периферической крови годовиков карпа украинской рамчатой и чешуйчатой пород, такие же исследования были проведены в хозяйстве СГЦР "Подилля". Результаты сравнительного анализа представлены на рис. 2.

Статистически достоверные отличия между группой рамчатого и чешуйчатого карпа СГЦР "Подилля" наблюдать за количеством ЭМЯ ($P<0,001$; $t_{st} = 3,7$) и ДЛ ($P<0,01$; $t_{st} = 2,8$).

По результатам проведенных исследований породной специфичности уровня цитогенетических нарушений, на основе микроядерного теста и анализа частот апоптозов, в группах рамчатых и чешуйчатых карпов двух хозяйств выявлено, что карп рамчатой породы характеризуется высшим уровнем дестабилизации хромосомного аппарата, сравнительно с чешуйчатой, при условии действия на их генетический аппарат одних и тех же эндогенных и экзогенных факторов.

Уровень цитогенетических нарушений в эритроцитах и лимфоцитах зависит от многих факторов, в частности и от возраста исследуемых организмов. Поэтому следующим этапом исследований был анализ возрастной динамики уровня цитогенетических показателей карпа украинской рамчатой и чешуйчатой пород.

В трех возрастных группах рамчатого карпа СГЦР "Подилля" было установлено, что наивысшим уровнем эритроцитов с микроядрами характеризовались годовики (рис. 3).

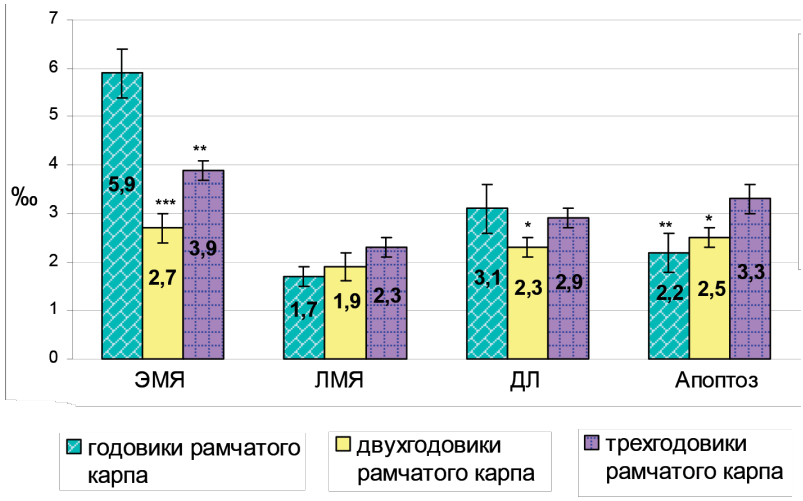


Рис. 3. Возрастная динамика уровня цитогенетических показателей рамчатого карпа
Fig. 3. Age dynamics for the level of cytogenetic indicators of framed carp

По частотам эритроцитов с микроядрами статистически достоверные отличия наблюдали между всеми возрастными группами рамчатого карпа, так между годовиками и двухгодовиками ($P<0,001$; $t_{st} = 3,7$), между годовиками и трехгодовиками ($P<0,01$; $t_{st} = 2,8$). По частотам двуядерных лимфоцитов

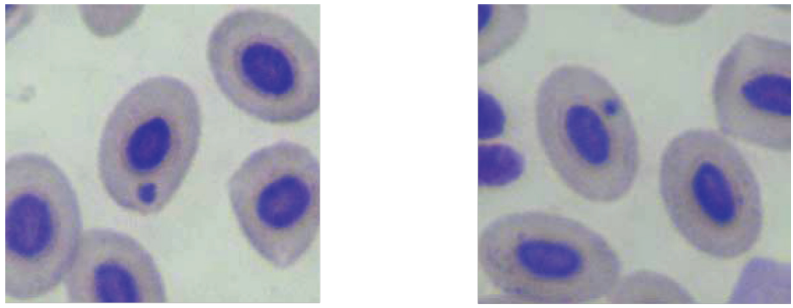
зафиксированы статистически достоверные отличия между группами годовиков и двухгодовиков ($P<0,05$; $t_{st} = 2,1$).

В результате сравнительного анализа частот апоптозов были установлены статистически достоверные отличия между группами годовиков и трехгодовиков ($P<0,01$; $t_{st} = 2,8$), двухгодовиков и трехгодовиков ($P<0,05$; $t_{st} = 2,1$). В свою очередь, за количеством лимфоцитов с микроядрами достоверных отличий в разновозрастных группах рамчатого карпа не выявлено.

Также стоит отметить, что для годовиков характерен высокий уровень индивидуальной изменчивости за частотой ЭМЯ. Высокий уровень клеток периферической крови с микроядрами, при невысокой частоте апоптозов, может свидетельствовать о толерантности геномов исследуемых рыб к данному типу повреждения генетического материала, в связи с чем мутантные клетки не поддаются апоптозу (Ярилин, 2003; Ali и др., 2008).

Анализируя размер микроядер можно судить о кластогенном или анеугенном эффекте генотоксических агентов. Повышенная частота клеток с микроядрами является биомаркером генотоксичних эффектов, возникновение которых может быть обусловлено влиянием и кластогенных и анеугенных агентов (Архипчук, 2008; Al-Sabti и Metcalfe, 1995). По нашему мнению на рис. 4 (а) эритроцит с микроядром сформированным в результате действия анеугенных агентов.

Вещества данного класса приводят к повреждению веретена деления или кинетохора, в результате чего происходит задержка целых хромосом в экваториальной зоне клетки, соответственно они не расходятся к полюсам в анафазе и не объединяются в телофазные ядра дочерних клеток, а формируют одно или несколько сопутствующих ядер в цитоплазме одной из дочерних клеток. Кластогенные агенты индуцируют повреждение первичной структуры ДНК и приводят к образованию ацентрических фрагментов хромосом, которые в дальнейшем формируют микроядра значительно меньшего размера чем при воздействии анеугенных агентов, что мы можем наблюдать на рис. 4 (б).

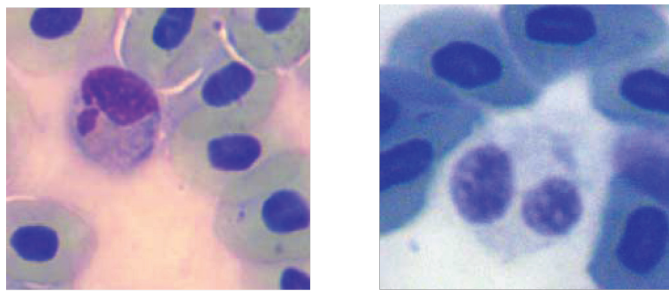


(а) (б)

Рис. 4. (а), (б) эритроциты с микроядрами (10×100)
Fig. 4. (a), (b) erythrocytes with micronucleus (10×100)

Клетки белой крови карпа имеют лимфоидный характер поскольку среди лейкоцитов 80–95% приходится на лимфоциты (Иванова, 1982). Для комплексной оценки уровня дестабилизации хромосомного аппарата рыб, кроме нарушений в эритроцитах, нами было учтено количество аномальных лимфоцитов. Микроядра могут формироваться и при отсутствии клеточного деления. Ядро сначала формирует лопасть, которая отслаивается, образовывая микроядро в цитоплазме клетки (рис. 5 (а)). Цитологические исследования показали, что они, как правило, сформированные из гетерохроматина (Ильинских. и др., 1992).

Повышенная частота двуядерных лимфоцитов (рис. 5 (б)), в клетках периферийной крови отображает нарушение в прохождении конечной стадии митотического деления – цитокинеза.



(а) (б)

Рис. 5. (а) лимфоцит с микроядром, (б) двуядерный лимфоцит (10×100)
Fig. 5. (a) lymphocyte with micronucleus, (b) binuclear lymphocyte (10×100)

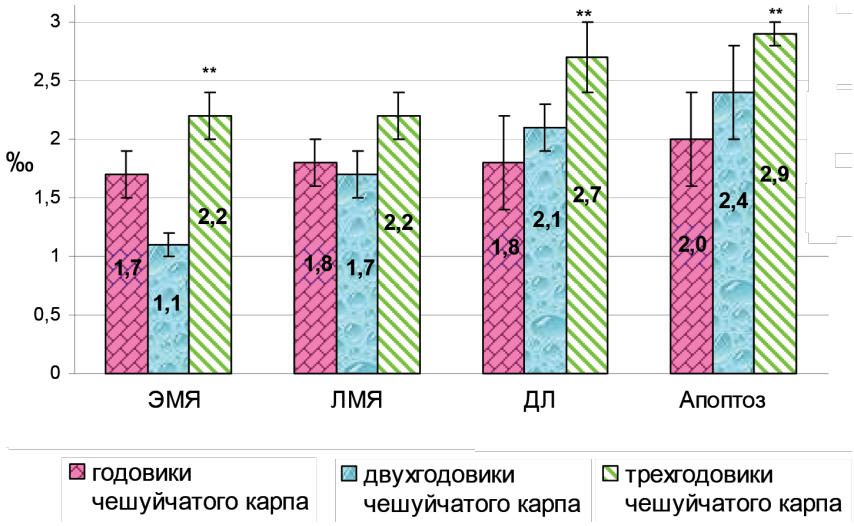


Рис. 6. Возрастная динамика уровня цитогенетических показателей чешуйчатого карпа
Fig. 6. Age dynamics for the level of cytogenetic indicators of scaled carp

Стоит отметить, что на третьем году индивидуального развития рамчатого карпа наблюдается рост уровня цитогенетических показателей по всем исследуемым характеристикам. Также возрастную динамику уровня цитогенетических показателей было проанализировано на группах чешуйчатого карпа (рис. 6). В трех возрастных группах карпа не наблюдали высокой индивидуальной изменчивости за количеством эритроцитов с микроядрами, лимфоцитов с микроядрами и двуядерных лимфоцитов.

По результатам исследований установлено, что годовики чешуйчатого карпа сравнительно с двухгодовиками характеризуются высшими значениями эритроцитов с микроядрами (1,7±0,2‰) и лимфоцитов с микроядрами (1,8±0,2‰). В свою очередь за количеством двуядерных лимфоцитов и апоптозов двухгодовики характеризуются высшими значениями. По количеству эритроцитов с микроядрами статистически достоверные отличия наблюдали между двух- и трехгодовиками ($P<0,01$; $t_{st} = 2,8$)

По количеству лимфоцитов с микроядрами в трех возрастных группах чешуйчатого карпа статистически достоверных отличий не выявлено. Сравнивая частоты двуядерных лимфоцитов были установлены статистически достоверные отличия между группами годовиков и трехгодовиков ($P<0,01$; $t_{st} = 2,8$). В свою очередь за активностью прохождения процесса апоптоза достоверные отличия наблюдали между группой годовиков и трехгодовиков ($P<0,01$; $t_{st} = 2,8$).

Обсуждение результатов

Результаты исследований групп рамчатого и чешуйчатого карпа показали, что клетки периферической крови эритроидного и лейкоцитарного ряда демонстрируют в мониторинговых исследованиях разную степень чувствительности к действию генотоксических агентов.

Анализируя частоты цитогенетических нарушений в клетках крови рыб было установлено, что группы карпа украинской рамчатой породи с ОАО „Горный Тикич” и СГЦР „Подилля” статистически достоверно характеризовались высшим уровнем эритроцитов с микроядрами и двуядерных лимфоцитов в сравнении с группами карпа чешуйчатой породы этих же хозяйств. Проведенные исследования разновозрастных групп карпа показали, что годовики, двухгодовики и трехгодовики рамчатого карпа СГЦР „Подилля” характеризуются высшим уровнем цитогенетических показателей сравнительно с такими же возрастными группами чешуйчатого, что свидетельствует о породной специфичности уровня цитогенетических нарушений. Стоит отметить, что у рамчатого карпа, так как и чешуйчатого, на третьем году индивидуального развития наблюдается рост уровня цитогенетических нарушений. По нашему мнению, данное явление связано с началом на третьем году онтогенеза карпа процесса полового созревания, который сопровождается снижением иммунного статуса рыб.

Также в трех возрастных группах рамчатых и чешуйчатых карпов зафиксировано тенденцию к увеличению количества апоптозов с возрастом (рис. 3; рис. 6). По нашему мнению это связано с ростом общего числа

мутантных клеток в периферической крови рыб и их элиминацией путем апоптоза. Отдельные авторы отмечают, что накопление стареющих клеток в тканях объясняется возрастной резистентностью к апоптозу (Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В., 2002). Согласно другой точке зрения, с возрастом повышается чувствительность к индукции апоптоза лимфоцитов (Анисимов В.Н., 2008).

Таким образом, была установлена породная специфичность и возрастная динамика уровня цитогенетических нарушений карпов рамчатой и чешуйчатой пород. Выявленные особенности подтверждают высокую чувствительность микроядерного теста при оценке физиологического состояния рыб, в зависимости от условий разведения и возрастных изменений.

Выявлена возрастная динамика уровня цитогенетических показателей у карпов рамчатой и чешуйчатой пород. Установлено, что на третьем году индивидуального развития чешуйчатых и рамчатых карпов СГЦР "Подилля" наблюдается рост уровня цитогенетических нарушений за количеством ЕМЯ, ЛМЯ, ДЛ, а так же апоптозов сравнительно с двухгодовиками.

Было установлено, что годовики, двухгодовики и трехгодовики рамчатого карпа СГЦР "Подилля" характеризуются высшим уровнем цитогенетических показателей сравнительно с аналогичными возрастными группами чешуйчатого карпа.

Литература

Ahmad K., Salehl J. (2010). Clastogenic studies on Tandaha Dam water in Asser. J. Black Sea/Mediterranean Environ., 16, 1: 33–42.

Ali F.Kh., El-Shehawi A.M., Seehy M.A. (2008). Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. Afr. J. Biotechnol., 7, 5: 606–612.

Al-Sabti K., Metcalfe C.D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. Res., 343, 2–3: 121–135.

Andrade V.M., Silva J., Silva F.R. (2004). Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. Environ. Mol. Mutagen, 44: 459–468.

Анисимов В.Н. (2008). Молекулярные и физиологические механизмы старения. Т. 1. [2-ое изд., перераб. и дополн.]. СПб. : Наука, 481.

Архипчук В.В. (2008). сост. : Малиновская М. В., Архипчук В. И. Исследования в области цитогенетики рыб и биотестирования. (сборник научных трудов). К.: Реликвии, 536.

Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. (2002). Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 320.

Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л. Я. (2006). Патология крови рыб. К.: ИНКОС, 206.

Есауленко А.В, Косякова Г.П. (2003). Цитогенетическое изучение кроветворных клеток рыб Каспийского бассейна. Актуальные проблемы генетики : Вторая конф. МОГиС : тезисы докл. 341–342.

Иванова Н.Т. (1982). Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб). М: Легкая и пищевая промышленность, 184.

Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н. (1992). Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск : Изд-во Том ГУ, 272.

Плохинский Н.А. (1970). Руководство по биометрии для зоотехников.М. : Колос, 256.

Ярилин А.А. (2003). Апоптоз и его роль в целостном организме. Глаукома. Вып., 2: 46–54.

Zatwierdzono do druku 8 VII 2013

IGOR GRYTSINIAK, YULIA GLUSHKO, SERGEY TARASJUK

Cytogenetic profile of the Ukrainian carp

SUMMARY

Analysis of the frequency of cytogenetic indicators (erythrocytes with micronucleus, lymphocytes with micronucleus, binuclear lymphocytes and apoptosis) in the peripheral blood cells of carps of the Ukrainian framed and scaled breeds from OAO "Girsky Tikych" and SGCB "Podillya" (Ukraine) was performed.

The age dynamics for the level of cytogenetic indicators of carp of three age groups from SGCB "Podillya" was observed. It was established that all age groups of framed carp compared with scaled groups of carps were characterized by a high level of cytogenetic anomalies.

Key words: cytogenetic analysis, micronucleus assay, chromosomal apparatus, scaled carp, framed carp