

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РІЗНОВІКОВИХ ГРУП БІЛОГО ТА СТРОКАТОГО ТОВСТОЛОБИКІВ ДП РИБГОСПУ «ГАЛИЦЬКИЙ»

Ю. М. Глушко, Н. О. Борисенко, С. І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААН

Виконано порівняльний аналіз рівня цитогенетичних показників (еритроцитів з мікроядрами, лімфоцитів з мікроядрами, двоядерних лімфоцитів та апоптозів) в клітинах периферійної крові білого та строкатого товстолобиків різних вікових груп ДП рибгоспу «Галицький». Встановлено, що група однорічок білого товстолобика характеризується вищим значенням цитогенетичних порушень, порівняно з групою строкатого. Статистично вірогідні міжгрупові відмінності виявлено за кількістю ЕМЯ ($P < 0,05$), ДЛ ($P < 0,05$). Встановлено, що дворічки білого товстолобика характеризуються нижчим рівнем еритроцитів з мікроядрами ($2,9 \pm 0,3\%$) та вищим рівнем апоптозів ($4,4 \pm 0,2\%$) порівняно з однорічками. У дворічок строкатого товстолобика також спостерігали зниження кількості мікроядерних еритроцитів ($2,4 \pm 0,2\%$) та зростання апоптозів ($4,6 \pm 0,3\%$).

Основним напрямом аквакультури на внутрішніх водоймах України є ставове рибництво, яке становить головний резерв подальшого нарощування обсягів виробництва. Традиційними об'єктами риборозведення в аквакультурі України є коропові риби, зокрема білий та строкатий товстолобики. Для одержання якісного племінного матеріалу необхідно забезпечувати оптимальні умови існування, які безпосередньо залежать від екологічного стану водойм. Накопичення генотоксинів різної природи у ставах призводить до підвищення рівня соматичних мутацій риб та як результат зниження їх життєздатності. Зниження стабільності хромосомного апарату риб з віком відображає загальну тенденцію до накопичення генетичного вантажу протягом індивідуального розвитку. Як показник дестабілізації хромосомного апарату риб використовують цитогенетичні методи, зокрема, мікроядерний тест, який дозволяє оцінити частоту мікроядер індукованих фізичними, хімічними та біологічними мутагенами та використовується як скринінг-систем для кластогенних та анеугенних агентів [1, 2]. Облік мікроядер в інтерфазі технічно простіший та оперативніший порівняно з підрахунком частот геномних мутацій та хромосомних аберацій у метафазі. Формування мікроядер може відбуватися в клітинах будь-якої тканини організму, здатних до поділу. Механізм утворення мікроядер в цитоплазмі клітини відрізняється від хромосомних аберацій, тобто даний тест є додатковою характеристикою, яка об'єднує частину типів хромосомних аберацій (внутрішньохромосомних пошкоджень), а також геномних мутацій (варіанти анеуплоїдії та поліплоїдії клітин). Сьогодні, мікроядерний тест на рибах широко використовується в різних країнах світу таких як: Бразилія, Туреччина, Росія, Німеччина, Угорщина та Польща [3, 4, 5]. Переваги мікроядерного тесту для скринінгу мутагенних агентів водного середовища були вивчені на клітинах периферійної крові, зяберних дуг, селезінки, печінки, спинного мозку та тимусу [6].

З метою встановлення видоспецифічної залежності рівня цитогенетичних показників риб нами було виконано мікроядерний тест в групах однорічок білого та строкатого товстолобиків, штучно вирощуваних у водоймі охолоджувачі рибного господарства «Галицький».

Матеріали і методи. Цитогенетичні дослідження виконували на репрезентативній

вибірці білого та строкатого товстолобиків ДП рибгоспу «Галицький» Івано-Франківської обл. В червні 2013 р. було відібрано дві групи однорічок та дворічок білого товстолобика в кількості 7 та 12 особин відповідно, а також дві групи однорічок та дворічок строкатого товстолобика в такій же кількості. На господарстві в польових умовах у кожної особини з хвостової вени стерильним шприцом відбирали краплину периферійної крові і готували мазки методом роздавленої краплі. Фіксували препарати метиловим спиртом і фарбували за методом Романовського стандартним розчином Гімза. Аналізували клітини з використанням бінокулярного мікроскопа "Primo Star Zeiss" зі збільшенням 100×10. На препаратах підраховували частоту еритроцитів з мікроядрами (ЕМЯ) не менше ніж у 3000 клітин, одноподібних лімфоцитів з мікроядрами (ЛМЯ), двоядерних лімфоцитів (ДЛ) та апоптозів (АП) не менше ніж у тисячі клітин [7]. Отримані дані виражали в проміле (‰). Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента (t_s).

Результати та обговорення. Багаточисельні дослідження показали, що кровотворна система риб дуже чутлива до змін стану водного середовища, тому реєстрація морфологічно змінених клітин крові дає можливість дати швидку відповідь про чутливість вирощуваних риб до дії генотоксинів. Рівень хромосомних аберацій та геномних мутацій в клітинах периферійної крові риб безпосередньо залежить не лише від екологічного стану водойми, але й від виду досліджуваних представників аквакультури [8, 9, 10]. У своїх дослідженнях Ферга та Ель-Шехаві за використання мікроядерного тесту на чотирьох видах риб продемонстрували різні значення порушень хромосомного матеріалу [11].

З метою встановлення видоспецифічної залежності рівня цитогенетичних показників риб нами було виконано мікроядерний тест на репрезентативній вибірці однорічок білого та строкатого товстолобиків штучно вирощуваних у водоймі охолоджувачі рибного господарстві «Галицький». Результати цитогенетичного аналізу представлені на рис. 1.

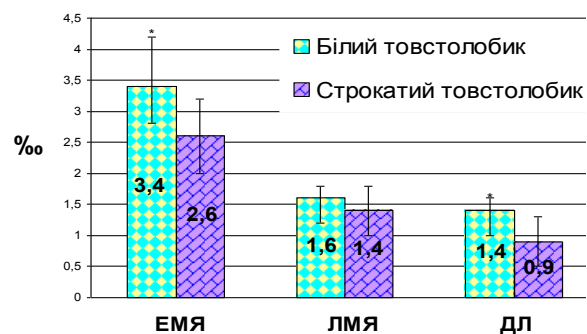


Рис. 1. Рівень цитогенетичних порушень однорічок білого та строкатого товстолобиків

Встановлено, що група білого товстолобика характеризується вищими значеннями цитогенетичних порушень як в клітинах еритроцитарного, так і лейкоцитарного рядів. Статистично вірогідні відмінності між групами білого та строкатого товстолобика виявлено за кількістю ЕМЯ ($P < 0,05$), ДЛ ($P < 0,05$). Відносно кількості лімфоцитів з мікроядрами (ЛМЯ), обидві групи риб характеризувались невисокими частотами близькими за значеннями. Ще одним важливим етапом цитодиференціації клітин багатоклітинних організмів є апоптоз, частоти якого також враховувалися (рис. 2). Запрограмована клітинна смерть є нормальним регульованим процесом самоліквідації на клітинному рівні, в результаті якого клітини фрагментуються на окремі апоптичні тільця. Фрагменти клітин, які загинули, зазвичай досить швидко фагоцитуються макрофагами або клітинами сусідами уникаючи розвитку запального процесу.

Однією з основних функцій апоптозу є знищення дефектних (пошкоджених, мутантних, інфікованих) клітин. В організмах риб апоптоз відіграє надзвичайно важливу роль в підтримці клітинного гомеостазу, в забезпеченні розвитку та функціонування імунної системи [11]. Не зважаючи на цей факт, що група строкатих товстолобиків характеризується

нижчими значеннями цитогенетичних порушень, рівень апоптозів в неї вищий, порівняно з групою білого. На нашу думку дане явище може бути результатом елімінації мутантних клітин у групі строкатих товстолобиків шляхом апоптозу.

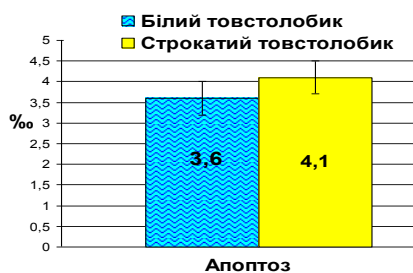


Рис. 2. Рівень апоптозу в клітинах периферійної крові однорічок білого та строкатого товстолобиків

У своїх роботах А. Єсауленко відмічав, що у риб, судячи з коефіцієнту варіабельності деяких цитогенетичних порушень, найбільш стабільними є особини дворічного віку [12]. Тому наступним кроком наших досліджень було встановлення рівня цитогенетичних порушень в клітинах периферійної крові дворічок білого та строкатого товстолобиків ДП рибгоспу «Галицький». Результати цитогенетичного аналізу наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Значення цитогенетичних показників дворічок білого та строкатого товстолобиків (n=12)

№ особини		ЕМЯ, ‰		ЛМЯ, ‰		ДЛ, ‰		Апоптоз, ‰	
		Білий товстолобик	Строкатий товстолобик	Білий товстолобик	Строкатий товстолобик	Білий товстолобик	Строкатий товстолобик	Білий товстолобик	Строкатий товстолобик
1	1	3	3	3	1	1	1	5	3
2	2	5	2	3	2	3	1	5	4
4	3	3	2	2	-	1	1	6	6
5	4	2	2	-	1	2	1	4	5
6	5	2	3	1	1	1	4	4	3
8	6	2	3	2	1	1	1	4	5
9	8	3	2	1	1	1	1	4	5
11	10	3	1	2	4	1	-	4	5
14	11	3	2	1	1	-	1	4	5
15	12	2	2	1	2	2	1	4	5
17	13	4	3	3	2	1	1	5	5
19	16	3	4	-	2	2	3	4	5
M±m		2,9±0,3	2,4±0,2	1,6±0,3	1,5±0,3	1,3±0,2	1,3±0,3	4,4±0,2	4,6±0,3

Результати цитогенетичного аналізу дворічок двох видів товстолобиків не показали статистично достовірних відмінностей за кожним із показників. Як і серед однорічок білого товстолобика, група дворічок даного виду характеризувалась вищими значеннями ЕМЯ та нижчим – апоптозів. Частоти порушень в клітинах лейкоцитарного ряду практично були на одному рівні.

В Україні подібні дослідження виконувались на представниках корошових риб таких як: лускатий короп та амурський сазан, де було встановлено, що сазан характеризується нижчими значеннями цитогенетичних порушень порівняно з коропом, проте вищими значеннями за частотою апоптозів [13]. Аналогічну тенденцію ми спостерігали при дослідженні двох видів товстолобиків.

Загалом, на базі ДП рибгосп «Галицький» в дворічок білого та строкатого товстолобиків виражених видоспецифічних особливостей за рівнем цитогенетичних показників не встановлено, проте спостерігали значні відмінності між групами однорічок та дворічок в межах виду. Тому наступним кроком досліджень було проведення аналізу вікової динаміки рівня цитогенетичних порушень в клітинах периферійної крові однорічок та дворічок білого та строкатого товстолобиків. Результати порівняльного аналізу наведено на рис. 3. та рис. 4.

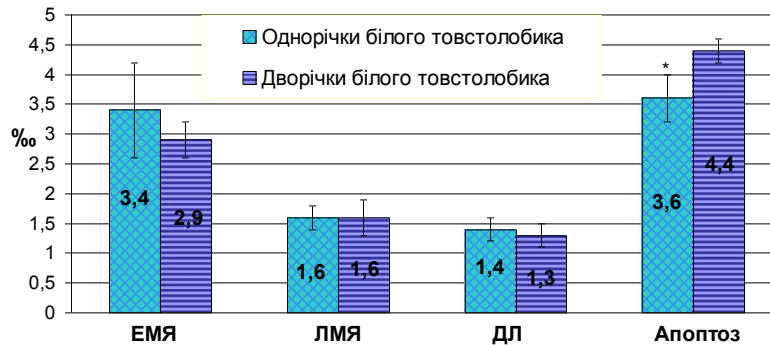


Рис. 3. Вікова динаміка рівня цитогенетичних показників білого товстолобика

Встановлено, що дворічки білого товстолобика характеризуються нижчим рівнем еритроцитів з мікроядрами ($2,9 \pm 0,3\%$) та вищим рівнем апоптозів ($4,4 \pm 0,2\%$) порівняно з однорічками. За частотою аномальних лімфоцитів вікової динаміки не було зафіксовано. Статистично достовірні відмінності ($P < 0,05$) спостерігали за частотою апоптозів.

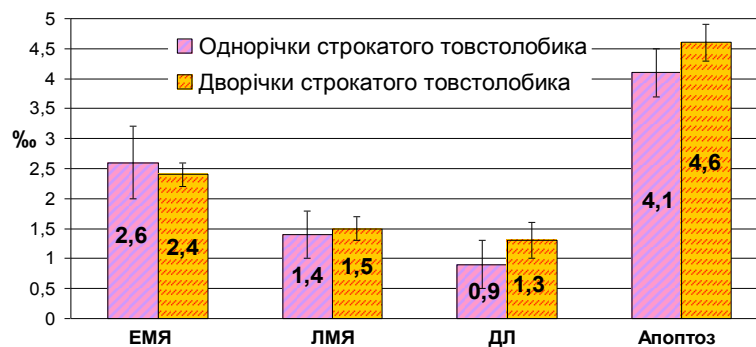


Рис. 4. Вікова динаміка рівня цитогенетичних показників строкатого товстолобика

Порівняльний аналіз в групах однорічок та дворічок строкатого товстолобика (рис. 4) продемонстрував аналогічну тенденцію, що і в групах білого. На другому році індивідуального розвитку спостерігали зниження кількості мікроядерних еритроцитів ($2,4 \pm 0,2\%$) та зростання апоптозів ($4,6 \pm 0,3\%$). В той же час в даній групі зафіксоване незначне зростання кількості аномальних лімфоцитів. Висунуто припущення, що не мітотичне утворення мікроядер – це шлях видалення з ядра дефектного хроматину. В дослідженнях Ізюмової Ю. Г. виявлено, що кількість клітин з МЯ знаходиться в зворотній кореляційній залежності ($R \pm m_r = -0,58 \pm 0,17$; $P < 0,001$) по відношенню до клітин з іншими ознаками різного ступеню деструкції ядер, таких як хроматиноліз, каріоліз, каріорексис. Всі вони відображають несприятливий токсикологічний стан серед представників аквакультури [14]. Облік цитогенетичних аномалій у клітинах периферійної крові можна використовувати на початкових стадіях інтоксикації, причому клітинами мішенями будуть, в першу чергу, еритроцити [10], що було продемонстровано в наших дослідженнях. Тому, на нашу думку, зниження кількості еритроцитів з цитогенетичними порушеннями у дворічок обох видів товстолобиків та зростання частоти апоптозів може бути результатом адаптації риб до умов існування.

ВИСНОВКИ

Результати досліджень показують, що мікроядерний тест на рибах є біомаркером фізіологічного стану об'єктів аквакультури та може використовуватися для контролю генотоксичності середовища. Встановлено, що при вирощуванні товстолобиків в однакових умовах, група однорічок білого товстолобика характеризуються вищим рівнем дестабілізації генетичного апарату порівняно з строкатим за всіма досліджуваними показниками. Аналіз вікової динаміки цитогенетичних порушень показав тенденцію до зниження кількості еритроцитів з мікроядрами та зростання частот апоптозів у дворічок, як білого так і строкатого товстолобиків.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому заплановано продовжити комплекс цитогенетичних досліджень на старших вікових групах білого та строкатого товстолобиків з використанням мікроядерного тесту та аналізу каріотипу. Дані підходи дадуть можливість визначити частку геномних мутацій та хромосомних аберацій в процесі індивідуального розвитку особин в результаті інтегральної дії екзогенних та ендогенних чинників.

CYTOGENETIC ANALYSIS OF DIFFERENT AGE GROUPS OF SILVER AND BIGHEAD CARPS FROM IE FISH FARM "GALYTSKIY"

Y. Glushko, N. Borisenko, S. Tarasjuk

Institute of Fisheries of NAAS

S U M M A R Y

The comparative analysis of occurrence frequency of cytogenetic indicators (erythrocytes with micronucleus, lymphocytes with micronucleus, binuclear lymphocytes and apoptosis) in the peripheral blood cells of silver and bighead carps from fish farm "Galytskiy" has been carried out. It was established that group of silver carp was characterized higher level of cytogenetic anomalies compared with group of bighead carp. Statistically significant inter-groups differences were found by the number of EMN ($P < 0.05$) and BL ($P < 0.05$). It has been established that two-years silver carps were characterized the lower level of erythrocytes with micronuclei ($2.9 \pm 0.3 \text{ ‰}$) and the higher level of apoptosis ($4.4 \pm 0.2 \text{ ‰}$) compared with one-years carps. Two-years of bighead carps also were characterized the lower level of erythrocytes with micronuclei ($2.4 \pm 0.2 \text{ ‰}$) and the higher level of apoptosis ($4.6 \pm 0.3 \text{ ‰}$).

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗНОВОЗРАСТНЫХ ГРУП БЕЛОГО И ПЕСТРОГО ТОЛСТОЛОБИКОВ ИП РЫБХОЗА «ГАЛИЦКИЙ»

Ю. Н. Глушко, Н. А. Борисенко, С. И. Тарасюк

Институт рыбного хозяйства НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Выполнен сравнительный анализ уровня цитогенетических показателей (эритроцитов с микроядрами, лимфоцитов с микроядрами, двуядерных лимфоцитов и апоптозов) в клетках периферической крови белого и пестрого толстолобиков разных возрастных групп ИП рыбхоза «Галицкий». Установлений, что группа годовиков белого толстолобика характеризуется высшим значением цитогенетических нарушений, сравнительно с группой пестрого. Статистически достоверные межгрупповые различия выявлены по

количеству ЭМЯ ($P < 0,05$) и ДЛ ($P < 0,05$). Установлено, что двухгодовики белого толстолобика имеют ниже уровень эритроцитов с микроядрами ($2,9 \pm 0,3\%$) и выше апоптозов ($4,4 \pm 0,2\%$) сравнительно с годовиками. У двухгодовиков пестрого толстолобика также наблюдали снижение количества микроядерных эритроцитов ($2,4 \pm 0,2\%$) и рост уровня апоптозов ($4,6 \pm 0,3\%$).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future / J. A. Heddle, M. C. Cimino, M. Hayashi [et al.] // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. — 1991. — Vol. 18, iss. 4. — P. 277–291.
2. Радиационная цитогенетика: русско-английский словарь-справочник / Э. Д. Демина, М. А. Пилинская, Ю. И. Петунин, Д. А. Ключин; [ред. Н. А. Дружина]. — К. : Здоровье, 2009. — 360 с.
3. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes / Clarice Torres de Lemos, Patrícia Milan Rödel, Nara Regina Terra [at al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. — 2007. — Vol. 66, Iss. 3. — P. 391–401.
4. *Tolga Cavas*. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment / Tolga Cavas, Serap Ergene-Gozukara // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. — 2005. — Vol. 46, № 1. — P. 64–70.
5. Кузина Т. В. Анализ патологических форм эритроцитов крови судака (*Stizostedion lucioperca*) Волго-Каспийского канала / Т. В. Кузина // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, № 1. — С. 37–41.
6. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test / V. M. Andrade, J. Silva, F. R. Silva [et al.] // *Environ. Mol. Mutagen.* — 2004. — Vol. 44. — P. 459–468.
7. Давыдов О. Н. Патология крови рыб / Давыдов О. Н., Темниханов Ю. Д., Куровская Л. Я. — К. : ИНКОС, 2006. — 206 с.
8. Архипчук В. В. Исследования в области цитогенетики рыб и биотестирования : [сборник научных трудов] / В. В. Архипчук ; сост. : М. В. Малиновская, В. И. Архипчук. — К.: Реликвии, 2008. — 536 с.
9. *Kamel Ahmad*. Clastogenic studies on Tandaha Dam water in Asser / Kamel Ahmad, Jaber Salehl // *Mediterranean Environment*. — 2010. — Vol. 16, № 1. — P. 33–42.
10. Житенева Л. Д. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб / Л. Д. Житенева, Т. Г. Полтавцева, О. А. Рудницкая. — Ростов н/Д. : Кн. изд-во, 1989. — 112 с.
11. Ярилин А. А. Апоптоз и его роль в целостном организме // *Глаукома*. — 2003. — Вып. 2. — С. 46–54.
12. Есауленко А. В. Цитогенетическое изучение кроветворных клеток рыб Каспийского бассейна / А. В. Есауленко, Г. П. Косякова // *Актуальные проблемы генетики: Вторая конф. МОГиС : тезисы докл.* — М., 2003. — С. 341–342.
13. Глушко Ю. М. Генетичний моніторинг і оцінка племінних ресурсів коропа в Україні : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. сільськогосподарських наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / Ю. М. Глушко — К., 2012. — 21 с.
14. Изюмов Ю. Г. Количество микроядер в эритроцитах периферической крови плотвы *Rutilus rutilus* и леща *Abramis brama* Рыбинского и Горьковского водохранилищ / Ю. Г. Изюмов, М. Г. Таликина, Ю. В. Чеботарева // *Биология внутренних вод*. — 2003. — № 1. — С. 98–101.