

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ СТРОКАТИХ ТОВСТОЛОБИКІВ ОКРЕМИХ РИБОГОСПОДАРСТВ УКРАЇНИ

Ю. М. ГЛУШКО, Н. О. БОРИСЕНКО, С. І. ТАРАСЮК

Інститут рибного господарства НААН (Київ, Україна)

niko-yulia@mail.ru

Виконано порівняльний аналіз рівня цитогенетичних показників (еритроцитів з мікроядрами, лімфоцитів з мікроядрами, двоядерних лімфоцитів та апоптозів) в клітинах периферійної крові дворічок строкатого товстолобика ДВСРП «Лиманське» та ДП рибгоспу «Галицький». Встановлено, що група строкатого товстолобика ДП «Галицький» характеризується вищим значенням ЕМЯ ($2,4\pm 0,2\%$), ЛМЯ ($1,5\pm 0,3\%$), ДЛ ($1,3\pm 0,3\%$) та апоптозів ($4,7\pm 0,3$) порівняно з групою ДВСРП «Лиманське». Статистично достовірні міжгрупові відмінності виявлено за частотою ЕМЯ ($P < 0,05$) та апоптозів ($P < 0,01$).

Ключові слова: строкатий товстолобик, мікроядерний тест, цитогенетичні показники, геномні мутації

CYTOGENETIC ANALYSIS OF BIGHEAD CARPS FROM CERTAIN FISH FARMS OF UKRAINE

Y. M. Glushko, N. O. Borisenko, S. I. Tarasjuk

Institute of Fisheries of NAAS (Kyiv, Ukraine)

The comparative analysis of cytogenetic indicators level (erythrocytes with micronucleus, lymphocytes with micronucleus, binuclear lymphocytes and apoptosis) in the peripheral blood cells of two-years bighead carps from fish farms «Lymanske» and «Galytskiy» has carried. It was established that group of bighead carp from fish farm «Galytskiy» characterized by a higher level of EMN ($2.4\pm 0,2\%$), LMN ($1.5\pm 0,3\%$), BL ($1.3\pm 0,3\%$) and apoptosis ($4.7\pm 0,3$) compared with group from fish farm «Lymanske». Statistically significant intergroups differences by the number of EMN ($P < 0.05$) and apoptosis ($P < 0.01$) were found.

Key words: bighead carp, micronucleus test, cytogenetic indicators, genomic mutations

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕСТРЫХ ТОЛСТОЛОБИКОВ ОТДЕЛЬНЫХ РЫБОХОЗЯЙСТВ УКРАИНЫ

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

Інститут рибного господарства НААН (Київ, Україна)

Выполнен сравнительный анализ уровня цитогенетических показателей (эритроцитов с микроядрами, лимфоцитов с микроядрами, двоядерных лимфоцитов и апоптозов) в клетках периферической крови двухгодовиков пестрого толстолобика ГПСРП «Лиманское» и ИП рыбхоза «Галицкий». Установлено, что группа пестрого толстолобика ИП «Галицкий» характеризуется высшими значениями ЭМЯ ($2,4\pm 0,2\%$), ЛМЯ ($1,5\pm 0,3\%$), ДЛ ($1,3\pm 0,3\%$) и апоптозов ($4,7\pm 0,3$) сравнительно с группой ГПСРП «Лиманское». Статистически достоверные межгрупповые различия выявлены по количеству ЭМЯ ($P < 0,05$) и апоптозов ($P < 0,01$).

Ключевые слова: белый толстолобик, пестрый толстолобик, микроядерный тест, цитогенетические показатели, геномные мутации

Вступ. Погіршення умов навколишнього середовища призводить до накопичення у рибогосподарських водоймах мутагенів, які, в свою чергу, підвищують мутаційний статус представників аквакультури. Розвиток методів біологічного моніторингу з використанням риб дає можливість перевірити ступінь забруднення водойми і в той час дати швидку відповідь про фізіологічний стан представників аквакультури при низьких концентраціях мутагенів. Цитогенетичний контроль стану хромосомного апарату риб, його цілісність, наявність структурних та кількісних порушень є невід'ємною частиною генетичної експертизи племінних ресурсів сільськогосподарських тварин. Саме цим зумовлена актуальність впровадження в рибогосподарську практику цитогенетичних тестів, що спрямовані на визначення характеру та ступеня впливу екзогенних і ендогенних чинників на геном риб. Мікроядерний тест на рибах – один із найпростіших, надійних та швидких цитогенетичних методів, який дозволяє визначити сумарну дію токсикантів на генетичний матеріал у конкретної особини, групи або популяції в цілому [1]. На сьогоднішній день, мікроядерний аналіз визнаний як один з найуспішніших і надійних тестів для вивчення механізмів впливу генотоксинів на живі організми [2–4http://catalog.belal.by/cgi-bin/irbis64r_01/cgiirbis_64.exe?Z21ID=&I21DBN=BELAL&P21DBN=BELAL&S21STN=1&S21REF=5&S21FMT=fullwebr&C21COM=S&S21CNR=20&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=M=&S21STR=]. Слід відзначити, що мікроядерний тест на рибах, активно використовується в різних країнах світу, так зокрема в Туреччині – на клітинах периферійної крові кефалі, у Росії – плотви, ляща, судака, коропа, у Бразилії – мересниці (гольян), у Польщі – коропа та сазана [5–9].

З метою встановлення залежності рівня цитогенетичних показників риб від умов розведення було виконано мікроядерний тест в групах дворічок строкатих товстолобиків, штучно вирощуваних у водоймах – охолоджувачах рибних господарств «Лиманське» та «Галицький».

Матеріали та методи досліджень. Для виконання цитогенетичного аналізу в червні 2013 р. у державному виробничому сільськогосподарсько-рибоводному підприємстві «Лиманське» Харківської обл. та дослідному підприємстві «Галицький» Івано-Франківської області було відібрано дві групи дворічок строкатого товстолобика в кількості по 12 особин в кожній групі. Рибу вирощували в спеціальних садках даних господарств, організованих на базі водойм-охолоджувачів для Комсомольської та Бурштинської ТЕС відповідно. У господарствах у кожної особини з хвостової вени стерильним шприцом відбирали краплину периферійної крові, наносили на попередньо підготоване предметне скло та готували мазки методом роздавленої краплі. Фіксували препарати метиловим спиртом і фарбували за методом Романовського стандартним розчином Гімза. Аналізували препарати з використанням бінокулярного мікроскопа «Primo Star Zeiss» зі збільшенням 100 \times 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 [10]. Отримані дані виражали в проміле (%). Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Стьюдента (t_s).

Результати та обговорення. У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що на другому році індивідуального розвитку товстолобика характеризуються найнижчим рівнем індивідуальної мінливості за цитогенетичними показниками [11]. Даний факт свідчить про те, що дослідження відповідної вікової категорії дає можливість більш об'єктивно оцінити вплив екзогенних генотоксичних чинників на геном риб. Оскільки мікроядерний тест є біомаркером сумарної генотоксичної дії екзогенних та ендогенних чинників, наступним кроком наших досліджень були оцінка та порівняльний аналіз рівня цитогенетичних показників у дворічок строкатих товстолобиків рибних господарств ДВSRП «Лиманське» та ДП «Галицький». Результати цитогенетичного аналізу показали, що товстолобика досліджуваних рибогосподарств характеризуються відносно невисокими значеннями цитогенетичних порушень як в клітинах еритроцитарного, так і лейкоцитарного рядів (рис. 1).

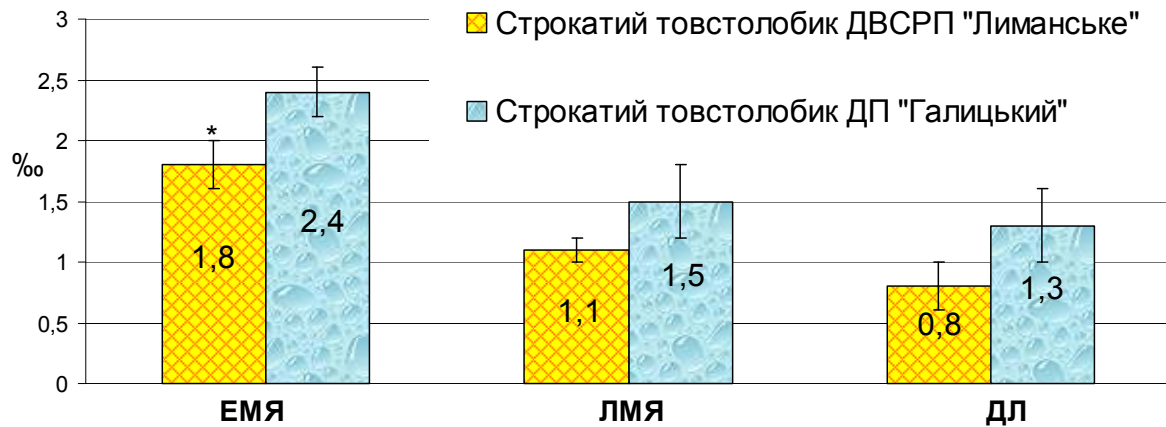


Рис. 1. Рівень цитогенетичних показників дворічок строкатого товстолобика різних рибогосподарств

Встановлено, що група товстолобиків ДВСРП «Лиманське» характеризується нижчим рівнем ЕМЯ ($1,8 \pm 0,2\%$), ЛМЯ ($1,1 \pm 0,1\%$), ДЛ ($0,8 \pm 0,2\%$). Статистично достовірні міжгрупові відмінності виявлено за частотою ЕМЯ ($P < 0,05$). За частотою лімфоцитів з мікроядрами та двоядерних лімфоцитів суттєвих міжгрупових відмінностей не виявлено, проте оцінюючи сумарне значення цитогенетичних порушень в клітинах даного ряду, можна говорити про те, що на імунну систему групи з ДП «Галицький» здійснюється більший тиск зовнішніх чинників. Дослідження Т. Каваса в трьох різних зонах Середземного моря на клітинах периферійної крові сірої кефалі (*Mugil cephalus*) показали, що кількість клітин з мікроядрами значно вища в зоні, де зафіксовано високий рівень ароматичних вуглеводнів [9]. Ще одним підтвердженням доцільності використання мікроядерного тесту як біомаркеру забруднення водного середовища є результати мікроядерного аналізу в еритроцитах периферичної крові риби голяян (*Pimephales promelas*) у місці скидання відходів нафтохімічного комплексу, де у риб було зафіксовано значне зростання цитогенетичних порушень [8].

Також важливим показником цитодиференціації клітин риб є апоптоз, частоти якого також нами враховувалися (табл. 1). Як відмічають дослідники [12, 13], апоптоз є високо регульованою формою запрограмованої клітинної загибелі з характерними морфологічними, біохімічними і генетичними ознаками, в результаті якої досягається кінцева мета – загибель генетично дефектної клітини.

1. Рівень апоптозу в клітинах периферійної крові строкатих товстолобиків ДВСРП «Лиманське» та ДП «Галицький»

№ особини	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	M±m, %
Строканий товстолобик ДВСРП «Лиманське»	2	3	3	3	3	4	4	5	4	4	4	4	$3,6 \pm 0,2$
Строканий товстолобик ДП «Галицький»	3	4	6	5	3	5	5	5	5	5	5	5	$4,7 \pm 0,3$

Встановлено, що група строкатого товстолобика ДП «Галицький» характеризується не лише вищими значеннями за результатами мікроядерного тесту, але і за частотою апоптозу ($4,7 \pm 0,3\%$). В організмах риб апоптоз відіграє надзвичайно важливу роль в забезпеченні розвитку та функціонування імунної системи, має позитивну кореляцію з концентрацією канцерогенів в навколишньому середовищі. Тому, на нашу думку, відносно високі значення апоптозу у групі строкатих товстолобиків ДП «Галицький» є результатом елімінації

генетично дефектних клітин даним шляхом та свідченням менш сприятливих умов розведення риб в даному господарстві порівняно з ДВСРП «Лиманське».

Загалом невисокі значення цитогенетичних порушень в групах дворічок строкатого товстолобика за результатами мікроядерного тесту та аналізу частот апоптозу свідчать про нижчу інтегральну генотоксичну дію екзогенних і ендогенних чинників та відповідно більш сприятливі умови розведення в ДВСРП «Лиманське» Харківської обл. порівняно з ДП «Галицький» Івано-Франківської обл.

Висновки. Встановлено, що група строкатих товстолобиків ДВСРП «Лиманське» характеризується нижчим рівнем за всіма цитогенетичними показниками порівняно з групою ДП «Галицький». Статистично достовірні міжгрупові відмінності виявлено за частотою ЕМЯ ($P < 0,05$) та апоптозів ($P < 0,01$). Отже, результати досліджень показують, що мікроядерний тест на рибках є біомаркером фізіологічного стану об'єктів аквакультури та може використовуватися для контролю генотоксичності водного середовища.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н. Н. Ильинских, В. В. Новицкий, Н. Н. Ванчугова [и др.]. – Томск : Изд-во ТомГУ, 1992. – 272 с.
2. 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. – Is. 4. – P. 277–291.
3. Архипчук, В. В. http://catalog.belal.by/cgi-bin/irbis64r_01/cgiirbis_64.exe?Z21ID=&I21DBN=BELAL&P21DBN=BELAL&S21STN=1&S21REF=5&S21FMT=fullwebr&C21COM=S&S21CNR=20&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=M=&S21STR= 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.
4. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes / Clarice Torres de Lemos, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651306000200> - <mailto:claricetl@fepam.rs.gov.br> Patricia Milan Ridel, Nara Regina Terra [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2007. – Vol. 66. – Is. 3. – P. 391–401.
5. Serap Ergene-Gozukara. Cytogenetic Analysis of a Mediterranean Gobiid Fish *Gobius paganellus* L. from Turkey / Serap Ergene-Gozukara, Tolga Cavas // Folia biologica (Krakow). – 2002. – Vol. 50. – № 1–2. – P. 5–8.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Давыдов, О. Н. Патология крови рыб / О. Н. Давыдов, Ю. Д. Темниханов, Л. Я. Куровская. – К. : ИНКОС, 2006. – 206 с.
11. Глушко, Ю. М. Цитогенетичний аналіз різновікових груп білого та строкатого товстолобиків ДП рибгоспу «Галицький» / Ю. М. Глушко, Н. О. Борисенко, С. І. Тарасюк // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин – 2014. – Вип. 15. – № 4. – с.133–139.

12. Варга, О. Ю. Что такое апоптоз и что дает знание о нем / О. Ю. Варга, В. А. Рябков // Экология человека. – 2006. – № 7. – С. 28.
13. Williams, G. T. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death / G. T. Williams, C. A. Smith // Cell. – 1993. – Vol. 74. – № 5. – P. 777–779.

REFERENCES

1. Il'inskikh, N. N., V. V. Novitskiy, and N. N. Vanchugova. 1992. *Mikroyadernyy analiz i tsitogeneticheskaya nestabil'nost' – Micronucleus assay and cytogenetic instability*. Tomsk, Izd-vo TomGU, 272 (in Russian).
2. Heddle, J. A., M. C. Cimino, and M. Hayashi. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 18 (4): 277–291.
3. Arkhipchuk, V. V. 2008. *Issledovaniya v oblasti tsitogenetiki ryb i biotestirovaniya – Research in the field of cytogenetics fish and bioassay*. Kyiv, Relikvii, 536 (in Ukrainian).
4. Clarice Torres de Lemos, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651306000200> - cor1mailto:claricetl@fepam.rs.gov.br Patr?cia Milan R?del, and Nara Regina Terra. 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66 (3): 391–401.
5. Ergene-Gozukara, S., and T. Cavas. 2002. Cytogenetic Analysis of a Mediterranean Gobiid Fish *Gobius paganellus* L. from Turkey. *Folia biologica (Kraków)*. 50 (1–2): 5–8.
6. Kuzina, T. V. 2010. Analiz patologicheskikh form eritrotsitov krovi sudaka (*Stizostedion lucioperca*) Volgo-Kaspiyskogo kanala – Analysis of pathological forms of red blood cells walleye (*Stizostedion lucioperca*) Volga-Caspian canal. *Fundamental'nye nauki i praktika – Basic Science and Practice*. 1 (1): 37–41 (in Russian).
7. Izyumov, Yu. G., M. G. Talikina, and Yu. V. Chebotareva. 2003. Kolichestvo mikroyader v eritrotsitakh perifericheskoy krovi plotvy *Rutilus rutilus* i leshcha *Abramis brama* Rybinskogo i Gor'kovskogo vodokhranilishch – The number of micronuclei in peripheral blood erythrocytes of roach *Rutilus rutilus* and bream *Abramis brama* Rybinsk and Gorky Reservoir. *Biologiya vnutrennikh vod – Biology of Inland Waters*. 1: 98–101 (in Russian).
8. Andrade, V. M., J. Silva, and F. R. Silva. 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.
9. Tolga, C., and S. Ergene-Gozukara. 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 46 (1): 64–70.
10. Davydov, O. N., Yu. D. Temnikhanov, and L. Ya. Kurovskaya. 2006. *Patologiya krovi ryb – Pathology of fish blood*. Kyiv, INKOS, 206 (in Ukrainian).
11. Glushko, Yu. M., N. O. Borisenko, S. I. Tarasyuk. 2014. Tsitogenetichniy analiz riznovikovykh grup bilogo ta strokatogo tovstolobikiv DP ribgospu «Galitskiy» – Cytogenetic analysis of different age groups of silver and bighead carps from ie fish farm "GALYTSKIY". *Naukovo-tehnichniy byuleten institutu biologiyi tvarin – Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Biology*. 15 (4): 133–139 (in Ukraine).
12. Varga, O. Yu., and V. A. Ryabkov. 2006. Chto takoe apoptoz i chto daet znanie o nem – What is apoptosis, and that gives knowledge of it. *Ekologiya cheloveka – Human ecology*. 7: 28 (in Ukrainian).
13. Williams, G. T., and C. A. Smith. 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*. 74 (5): 777–779.