

УДК 639.371.52:591.139

С. Е. ДРОМАШКО, О. В. КВИТКО, В. Ю. АФОНИН, И. И. КОНЕВА,  
В. Д. ТРУСОВА, Я. И. ШЕЙКО

### ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МАРКЕРА КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ В ТКАНЯХ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO L.*)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 22.04.2008)

В настоящее время наблюдается тенденция к накоплению данных по генотипированию различных видов животных, растений и бактерий, что обеспечивает возможность паспортизации ценных пород, сортов и штаммов. Для растений и животных знания о генетической структуре селекционного материала позволяют оценить степень гетерозиготности, а также определить резистентность к различным заболеваниям, чувствительность к которым меняется в условиях получения чистых линий. Для рыбного хозяйства страны актуальность проблемы определяется ее нацеленностью на увеличение производства рыбы, ускорение производимого селекционного отбора и создание новых пород карпа.

В последнее время неотъемлемой частью описания породы является наличие генетической характеристики, или паспортизации. Новизна данного исследования заключается в применении тестов на экспрессию генов, которые обычно не используются в геномном типировании сельскохозяйственных пород животных. В частности, обнаружение у различных видов животных экспрессии гена бета-галактозидазы, являющегося маркером клеточного старения, свидетельствует о возможности его использования для изучения процессов старения и чувствительности к мутагенному действию широкого ряда ксенобиотиков. Это делает перспективным применение данного маркера у рыб, поскольку позволяет дать оценку старения различных пород карпа (*Cyprinus carpio L.*) как многолетнего вида животных, используемого в сельском хозяйстве.

Одним из наиболее перспективных маркеров старения считается экспрессия гена бета-галактозидазы. В 1995 г. в работе G. P. Dimgi и др. [1] сообщалось, что по мере старения нормальных клеточных культур увеличивается количество клеток, окрашиваемых в синий цвет при цитохимической пробе, детектирующей активность фермента бета-галактозидазы. В этой работе цитохимическое окрашивание проводили при значении pH 6, а не при оптимальном для известного фермента бета-галактозидазы pH 4, поэтому авторы полагали, что при старении клеток увеличивается активность особого фермента, который отличается от известной лизосомной бета-галактозидазы. Новый фермент был назван ими связанной со старением бета-галактозидазой (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, или SA- $\beta$ -gal). В этой работе было показано также, что количество экспрессирующих SA- $\beta$ -gal клеток увеличивалось не только при старении клеточных культур, но и при увеличении возраста донора в срезах кожи. Эти результаты свидетельствуют о связи между старением *in vitro* и *in vivo*. Позже появились многочисленные данные, подтверждающие увеличение доли SA- $\beta$ -gal позитивных клеток с возрастом в различных тканях: происходило накопление положительных по SA- $\beta$ -gal клеток в печени [4], в почках [5] и в эндотелии [6]. Таким образом, многочисленные данные подтверждают положительную корреляцию активности бета-галактозидазы с клеточным старением.

**Объекты и методы исследования.** Темпы старения у рыб двух породных групп изобелинского карпа – чешуйчатого и зеркального – исследовали весной-осенью 2007 г. в селекционно-племенном участке «Изобелино». Экспрессию гена бета-галактозидазы в эритроцитах крови изуча-

ли у рыб-производителей (возраст от 6 до 10 лет), печень брали у товарных рыб в возрасте от 1 года до 4 лет.

Для изучения экспрессии гена бета-галактозидазы в эритроцитах крови производителей карпа кровь извлекали прижизненно из хвостовой вены и помещали в специальные пробирки (вакутайнеры) со стандартным количеством гепарина. Вакутайнеры размещали в термос со льдом и водой и транспортировали в лабораторию моделирования генетических процессов Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Из образцов крови на стандартных цитологических стеклах (слайдах) изготавливали мазки-отпечатки, которые позже высушивали на воздухе.

Для исследования экспрессии гена бета-галактозидазы в печени карпа пробы печени помещали в стерильные пластиковые пробирки и в максимально короткое время перевозили в ту же лабораторию. Во время транспортировки герметически закрытые пробирки с пробами находились в термосе со льдом и водой. Изготавливали мазки-отпечатки ткани печени на стандартных цитологических стеклах (слайдах).

Детекцию экспрессии гена бета-галактозидазы при pH 6,0 производили с помощью субстратного красителя X-gal по модифицированному нами методу G. P. Dimgi и др. [1], применяемому для оценки активности бета-галактозидазы в культивируемых клетках. Согласно данному методу, хромогенный краситель X-gal расщепляется содержащейся в клетке бета-галактозидазой и окрашивает клетку в синий цвет. Клетки на стеклянной или пластиковой ростовой поверхности отмываются два раза фосфатным буфером и фиксируются 3%-ным раствором формальдегида на фосфатном буфере в течение 5 мин. Затем клетки снова отмываются два раза фосфатным буфером и в течение 24 ч инкубируются при температуре 37 °C красящим раствором следующего состава: 1 мг/мл раствора 5-бromo-4хлоро-3-индолил-бета-D-галактозида (X-gal, маточный раствор – 20 мг/мл X-gal в диметилформамиде), 40 мМ буфера лимонная кислота/фосфат натрия (pH 6,0), 5 мМ ферроцианида калия, 5 мМ феррицианида калия, 150 мМ хлорида натрия, 2 мМ хлорида магния. После окраски клетки отмываются два раза фосфатным буфером и три раза в восходящих концентрациях этанола (24, 48 и 96%). Препараты с клетками высушиваются на воздухе и хранятся в комнатных условиях. С помощью микроскопа регистрируются окрашенные (бета-гал-позитивные) и неокрашенные клетки.

Для окраски высушенных на воздухе мазков-отпечатков из крови и ткани печени по активности бета-галактозидазы использовали изложенную выше методику окраски клеток мыши. Отличие состояло в том, что в целях экономии дорогостоящего субстратного хромогенного красителя X-gal на предметное стекло с мазком-отпечатком после его фиксации наносили каплю раствора X-gal, которую распределяли по мазку-отпечатку путем наложения сверху второго предметного стекла. Затем мазок-отпечаток инкубировали в течение 24 ч при 37 °C во влажной камере (для предотвращения упаривания раствора X-gal). После окраски стекла с мазками-отпечатками промывали в восходящих концентрациях этанола (24, 48 и 96%) и высушивали на воздухе.

Для статистической обработки данных по экспрессии гена бета-галактозидазы использовали статистический анализ вариации по качественным признакам П. Ф. Рокицкого [7].

Часть окрашенных по бета-галактозидазе препаратов из ткани печени вторично фиксировали и окрашивали по стандартной методике Гимза.

Было обнаружено, что распределение отдельных бета-гал-активных клеток и их скоплений или агрегатов (включающих две или более, в том числе до нескольких десятков, клеток) на разных участках цитологических препаратов из образцов ткани печени карпа не коррелирует с количеством паренхиматозных клеток печени, поэтому количественную оценку экспрессии гена бета-галактозидазы выполняли путем учета окрашенных по бета-гал-единичных клеток и клеточных скоплений на всем препарате, а не посредством расчета их доли среди паренхиматозных клеток.

**Результаты и их обсуждение.** При исследовании мазков-отпечатков из крови карпа не было выявлено клеток, окрашенных X-gal в синий цвет (пример цитологического препарата из крови, демонстрирующего эритроциты, приведен на рис. 1). Таким образом, экспрессия гена бета-галактозидазы в эритроцитах крови не выявляется, следовательно, не представляется возмож-

ным использование данного теста на эритроцитах периферической крови, которую можно прижизненно получать из хвостовой вены карпов.

В то же время была выявлена экспрессия гена бета-галактозидазы на мазках-отпечатках из печени карпа. Это проявилось в наличии на мазках-отпечатках окрашенных по бета-галактозидазе одиночных клеток и клеточных скоплений (агрегатов, включающих от двух до нескольких десятков клеток). На рис. 2 в центре видно компактное скопление клеток, интенсивно окрашенных по бета-галактозидазе (черная окраска), расположенное среди клеток, вторично окрашенных по Гимза (темно-серая окраска), а также одиночных клеток на периферии, окрашенных по бета-галактозидазе в светло-серый цвет.

Число бета-гал-позитивных клеток на разных участках цитологических препаратов печени карпа не коррелировало с числом паренхиматозных клеток печени, не окрашенных по бета-галактозидазе, поэтому для оценки экспрессии гена бета-галактозидазы целесообразно учитывать все одиночные клетки и клеточные скопления, окрашенные X-gal, на всем препарате, а не посредством расчета их доли среди паренхиматозных клеток.

В таблице представлены данные, демонстрирующие выраженные межиндивидуальные различия в экспрессии гена бета-галактозидазы в обеих породных группах (чешуйчатой и зеркальной). Высокая вариация среди мазков-отпечатков из печени (по одному препарату от особи) проявлялась как по количеству одиночных бета-гал-позитивных клеток, так и по числу окрашенных клеточных скоплений. Так, число одиночных окрашенных клеток в чешуйчатой породной группе (6 рыб) изменялось от 29 до 318, а в зеркальной (4 особи) – от 60 до 213. Выраженная вариация в обеих породных группах обнаружилась и в отношении числа окрашенных X-gal клеточных скоплений. Число экспрессирующих ген бета-галактозидазы клеточных скоплений в чешуйчатой породной группе на четырех препаратах изменялось от 8 до 269, а в зеркальной – от 3 до 108.

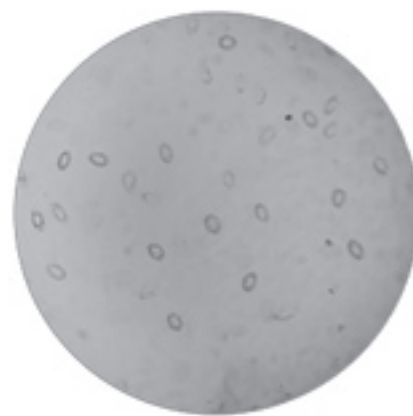


Рис. 1. Эритроциты крови карпа не окрашиваются цитохимическим хромогенным красителем X-gal и, следовательно, в них не выявляется экспрессия гена бета-галактозидазы

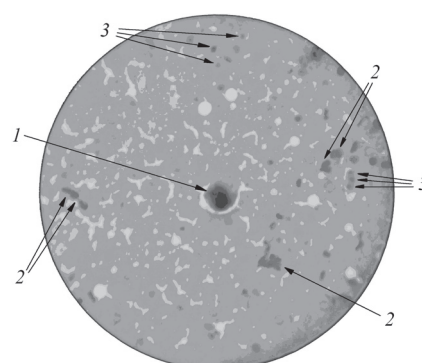


Рис. 2. Экспрессия гена бета-галактозидазы в клетках печени карпа: в центре видно компактное скопление клеток, интенсивно окрашенных по бета-галактозидазе (черная окраска, 1), расположенное среди клеток, вторично окрашенных по Гимза (темно-серая окраска, 2), а также одиночных клеток, окрашенных по бета-галактозидазе в светло-серый цвет (3)

**Экспрессия гена бета-галактозидазы в печени изобелинского карпа различных породных групп (товарная рыба, трехлетка)**

Номер особи	Число одиночных клеток, окрашенных X-gal	Число клеточных скоплений, окрашенных X-gal	Сумма одиночных клеток и клеточных скоплений, окрашенных X-gal	Доля клеточных скоплений среди суммы одиночных клеток и клеточных скоплений, окрашенных X-gal, %
<i>I породная группа (чешуйчатая)</i>				
1	192	269	461	58,4±2,3
2	149	25	174	14,4±2,7
3	160	205	365	56,2±2,6
4	29	8	37	21,6±6,8
5	318	9	327	2,8±0,9
6	163	14	177	7,9±2,8
<i>II породная группа (зеркальная)</i>				
1	154	108	262	41,2±3,0
2	60	96	156	61,5±3,9
3	213	98	311	31,5±2,5
4	103	3	106	2,8±1,4

Ясно, что при имеющихся относительно небольших выборках (6 и 4 особей от двух сравниваемых породных групп) статистически значимых различий между данными двумя породными группами по экспрессии гена бета-галактозидазы не выявляется. Вместе с тем полученных количественных данных достаточно, чтобы сделать вывод об отсутствии значительных различий по данному показателю между изучаемыми породными группами.

В связи с отсутствием существенных различий между двумя сравниваемыми породными группами по экспрессии гена бета-галактозидазы, на наш взгляд, особый интерес представляют данные о большой межиндивидуальной (внутригрупповой) вариации особей по этому признаку. Наличие резко выраженной внутригрупповой вариабельности возможно использовать для оценки фенотипической и генотипической гетерогенности популяций карпа, что может быть важно как для паспортизации пород и отводок, так и для селекционной работы в целом. Особый практический интерес может иметь будущее изучение корреляций между экспрессией гена бета-галактозидазы и другими характеристиками, включая трансферриновый генотип и хозяйственно значимые количественные признаки рыб.

Для количественной оценки экспрессии гена бета-галактозидазы на мазках-отпечатках наиболее корректно использовать не число одиночных окрашенных X-gal клеток или клеточных скоплений (либо их суммы), а долю экспрессирующих бета-гал клеточных скоплений среди общего числа окрашенных по бета-галактозидазе единичных клеток и клеточных скоплений.

Дело в том, что при используемом стандартном способе изготовления мазков-отпечатков количество ткани печени на разных препаратах может сильно варьировать, что может приводить к большой случайной (не связанной с реальными различиями) вариации числа бета-гал-позитивных клеток и клеточных скоплений. В этой ситуации относительный показатель (например, доля окрашенных клеточных скоплений среди общего числа окрашенных одиночных клеток и скоплений) должен в меньшей степени зависеть от количества тканевого материала, попадающего на мазки-отпечатки (в последней колонке таблицы приведены значения именно этого показателя). Видна ярко выраженная вариация данного показателя среди особей в обеих породных группах. Так, в чешуйчатой породной группе доля бета-гал-позитивных клеточных скоплений среди суммы бета-гал-позитивных единичных клеток и скоплений варьировала от  $2,8 \pm 0,9\%$  до  $58,4 \pm 2,3\%$ , а в зеркальной породной группе – от  $2,8 \pm 1,4\%$  до  $61,5 \pm 3,9\%$ . Важно отметить, что различия между особями внутри данных групп часто являются высокодостоверными.

Таким образом, полученные данные о резко выраженной межиндивидуальной вариации экспрессии гена бета-галактозидазы вызывают значительный интерес, но, несмотря на высокую формальную статистическую достоверность, нуждаются в скрупулезной проверке. В этой связи представляется целесообразным исследовать дисперсию экспериментальных данных по экспрессии гена бета-галактозидазы в печени карпа между разными мазками-отпечатками, изготовленными из одного образца.

Представляется также перспективным при планировании дальнейших исследований предусмотреть изучение корреляции экспрессии гена бета-галактозидазы с возрастом рыб (поскольку повышенная активность гена бета-галактозидазы является классическим маркером клеточного старения), а также с генами трансферрина и хозяйственно значимых признаков.

В целом полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований, направленных на разработку методов использования теста на экспрессию гена бета-галактозидазы в тканях печени как для паспортизации различных породных групп карпа, так и совершенствования селекционной работы в целом.

## Выводы

1. В результате исследований экспрессии гена бета-галактозидазы в тканях изобелинского карпа установлено, что при цитохимическом окрашивании эритроцитов периферической крови карпа с использованием субстратного хромогенного красителя X-gal не найдено клеток крови с характерной синей окраской, демонстрирующей экспрессию гена бета-галактозидазы. Впервые обнаружена экспрессия гена бета-галактозидазы в клетках печени карпа.

2. Показано, что распределение бета-гал-активных клеток и клеточных скоплений на разных участках цитологических препаратов не коррелирует с количеством паренхиматозных клеток печени, поэтому количественную оценку экспрессии гена бета-галактозидазы в ткани печени целесообразно выполнять путем учета окрашенных по бета-гал клеток на всем препарате. Для количественной оценки экспрессии гена бета-галактозидазы предложено вычислять долю бета-гал позитивных клеточных скоплений среди общего числа окрашенных по бета-галактозидазе единичных клеток и клеточных скоплений.

3. Получены данные о выраженной межиндивидуальной вариации в экспрессии гена бета-галактозидазы в печени рыб двух изученных породных групп изобелинского карпа (чешуйчатой и зеркальной). В частности, в чешуйчатой породной группе доля бета-гал-позитивных клеточных скоплений среди суммы бета-гал-позитивных единичных клеток и скоплений варьирует от  $2,8 \pm 0,9\%$  до  $58,4 \pm 2,3\%$ , а в зеркальной породной группе – от  $2,8 \pm 1,4\%$  до  $61,5 \pm 3,9\%$ . Различия между особями внутри данных групп часто являются высокодостоверными.

Работа выполнена в рамках задания 4.1.7 «Оценить генетическое разнообразие и создать эколого-генетические и молекулярно-биологические паспорта карпа белорусской селекции» ГП «Биотехнология».

### Литература

1. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo / G. P. Dimri [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 9363–9367.
2. Coates, P. J. Markers of senescence? / P. J. Coates // Journal of Pathology. – 2002. – Vol. 196. – P. 371–373.
3. Senescence-associated (beta) galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells / D. J. Kurz [et al.] // J. Cell Sci. – 2000. – Vol. 113. – P. 3613–3622.
4. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas / V. Paradis [et al.] // Hum. Pathol. – 2001. – Vol. 32. – P. 327–332.
5. Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and p21 (WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats / G. Ding [et al.] // Exp. Mol. Pathol. – 2001. – Vol. 70. – P. 43–53.
6. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis / E. Vasile [et al.] // FASEB J. – 2001. – Vol. 15. – P. 458–466.
7. Рокитский, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск: Высшая школа, 1964. – 326 с.

*S. E. DROMASHKO, O. V. KVITKO, V. Yu. AFONIN, I. I. KONEVA, V. D. TRUSOVA, Ya. I. SHEIKO*

#### **EXPRESSION OF THE MOLECULAR-BIOLOGICAL MARKER OF CELL AGEING IN TISSUES OF CARP (CYPRINUS CARPIO L.)**

#### **Summary**

The article deals with an expression of beta-galactosidase gene in various breed groups of carp (*Cyprinus carpio* L.) bred in Belarus. For the first time, the beta-galactosidase gene expression was found in carp liver cells, while there was no expression of this gene in peripheral blood erythrocytes. The data were obtained on evidence of difference of beta-galactosidase gene expression among individuals within two breed groups (common and mirror).