

УДК 639.371.5.09:575.224

С. Е. ДРОМАШКО¹, Е. В. ТАРАЗЕВИЧ², В. Ю. АФОНИН¹,
О. В. КВИТКО¹, В. Б. САЗАНОВ²

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ПОРОДНЫХ ГРУПП КАРПА (*CYPRINUS CARPIO* L.) К ЭКЗОГЕННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЯМ ДНК

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

²Институт рыбного хозяйства

(Поступила в редакцию 22.10.2009)

В настоящее 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 то же время в живых клетках существует ряд регуляторных механизмов, включающихся в ответ на повреждения ДНК различными мутагенными факторами. Регуляторные механизмы направлены на то, чтобы не допустить появления в организме большого числа мутантных клеток и клеток с измененным пролиферативным потенциалом. Репарация ДНК и апоптоз являются энергетически зависимыми процессами, конкурирующими друг с другом, что необходимо учитывать при анализе реакции на мутагенные воздействия таких пойкилотермных животных, как карп, чьи процессы на молекулярном, клеточном и физиологическом уровне зависят от температуры окружающей среды, а значит и времени года.

Цитогенетические исследования соматических клеток рыб в основном касаются изучения их биоиндикаторных способностей реагировать на изменения окружающей среды. Так, в лаборатории биомаркеров и биотестирования Института коллоидной химии и химии воды НАН Украины цитогенетические критерии рыб используют в биоиндикационных исследованиях [1, 2]. В то же время изучение цитогенетических эффектов повреждения ДНК у карпов различных отводок может являться эффективным методом описания разных пород, а введение в паспорт породы такого показателя будет способствовать ускорению и повышению качества селекционного процесса. Наиболее простым и доступным методом регистрации повреждений ДНК является учет аберраций хромосом на стадии метафазы [3, 4]. Широкое распространение имеет учет аберраций хромосом с помощью микроядерного теста. При параллельных исследованиях удалось установить, что большинство микроядер в клетках костного мозга представляют из себя хроматидные делеции [5, 6].

Цель настоящей работы – исследование чувствительности генома карпов различных породных групп к природному (время года) и техногенному (модельный ДНК-повреждающий агент митомицин С) факторам цитогенетическими методами для увязки этого параметра с наблюдаемыми различиями в жизнеспособности отдельных отводок.

Объекты и методы исследования. Исследования проводили в 2007–2008 гг. в лаборатории моделирования генетических процессов Института генетики и цитологии НАН Беларуси и лаборатории селекции и племенной работы Института рыбного хозяйства. Объектом исследования являлись особи разных отводок изобелинской породы карпа, содержащиеся в хозрасчетном участке «Вилейка». Анализ крови проводили в весенний период (до нереста), а также осенью.

Для анализа повреждений ДНК периферическую кровь забирали шприцом из хвостовой вены карпа и переносили в стерильную пробирку-вакутайнер (5 мл) с гепарином. Пробирки помещали в термостат с водой, температура которого соответствовала среде обитания карпа

на момент исследования. Мазки крови готовили на стеклах по общепринятой методике для гематологических исследований. Фиксировали мазки 96%-ным этанолом. Окраску проводили по Романовскому–Гимза. Время окрашивания и концентрацию красителя подбирали опытным путем. Микроскопический анализ проводили на микроскопе Olympus BH-2, окуляры 10×20, объектив ×100, иммерсионное масло (Olympus $nd=1,516$). Для фотографирования использовали цифровой фотоаппарат Olympus. Для учета классических цитогенетических параметров – микроядер – анализировали не менее 1000 эритроцитов на мазках, окрашенных по Романовскому–Гимза. ДНК-повреждающий мутаген митомицин С (0,5 мг/кг) *in vivo* вводили путем инъекции в хвостовую вену в комбинации с предварительным введением бета-нафтофлавона (40 мг/кг в течение 3 сут) – индуктора ферментов метаболической активации промутагенов [7].

Для анализа генетического полиморфизма периферическую кровь забирали шприцом из хвостовой вены карпа и переносили в стерильную пробирку-эппендорф (1,5 мл). После отбора пробы крови замораживали и до проведения электрофоретического анализа хранили в морозильной камере при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Генетико-биохимические исследования проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в камере вертикальной модификации Нефедова и Трувелера. ПААГ готовили по методу Девиса, окрашивание гелевых блоков – по модификации Таммерта. Белки трансферрина выявляли методом окрашивания в спиртово-уксусном растворе сложного красителя Кумасси и просветляли в таком же растворе без красителя. Закрепление окраски и временное хранение фореграмм проводили в спиртово-уксусном растворе.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета анализа данных Excel. Достоверность оценивали по критерию *t*-Стьюдента с учетом дисперсии (F-тест), а также использовали непараметрический критерий Ван дер Вардена из доступной в Internet демо-версии STADIA 7.0/ учебная для Windows (© Кулаичев А. П., 1996–2005).

Результаты и их обсуждение. Для оценки цитогенетических повреждений у особей разных отводок изобелинской породы карпа был проведен отбор проб (фенотипическая характеристика особей приведена в табл. 1).

Таблица 1. Фенотипическая характеристика двухлеток изобелинской породы карпа

| Экстерьерные показатели | Отводка «смесь зеркальная» | Отводка «три прим» | Отводка «смесь чешуйчатая» | Отводка «столин XVIII» |
|--|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Масса тела (<i>Q</i>), г | $\frac{350 \pm 17,34}{19,2}$ | $\frac{367 \pm 9,48}{10,2}$ | $\frac{336 \pm 20,79}{15,0}$ | $\frac{340 \pm 19,05}{14,7}$ |
| Упитанность (<i>K_y</i>), отн. ед. | $\frac{3,11 \pm 0,05}{6,8}$ | $\frac{3,22 \pm 0,05}{5,5}$ | $\frac{2,89 \pm 0,04}{5,7}$ | $\frac{2,73 \pm 0,04}{5,3}$ |
| Индекс головы (<i>C/I</i>), % | $\frac{28,8 \pm 0,39}{5,2}$ | $\frac{29,2 \pm 0,35}{4,6}$ | $\frac{26,9 \pm 0,26}{3,7}$ | $\frac{27,4 \pm 0,37}{4,8}$ |
| Индекс прогонистости (<i>I/H</i>), отн. ед. | $\frac{2,90 \pm 0,03}{4,4}$ | $\frac{2,76 \pm 0,03}{3,9}$ | $\frac{3,01 \pm 0,03}{3,6}$ | $\frac{2,92 \pm 0,2}{4,0}$ |
| Индекс толщины <i>Br/l</i> , % | $\frac{15,3 \pm 0,21}{5,3}$ | $\frac{15,4 \pm 0,33}{8,4}$ | $\frac{14,9 \pm 0,16}{4,1}$ | $\frac{15,1 \pm 0,19}{5,9}$ |

Примечание. Над чертой – средние значения $M \pm m$, под чертой – коэффициент вариации C_v , %.

Сравнивая показатели экстерьера разных отводок, можно отметить, что рыбы отводки «три прим» обладают превосходными значениями по всем показателям, за исключением индекса головы. Рыбы отводки «смесь зеркальная» обладают лучшими значениями показателей экстерьера, чем рыбы отводки «смесь чешуйчатая». Рыбы отводки «столин XVIII» имеют худшие значения среди четырех изучаемых отводок, за исключением индекса головы. Значение последнего показателя у отводки «столин XVIII» наилучшее.

Найденные значения необходимы для выявления корреляции между фенотипическими особенностями анализируемых отводок и уровнем спонтанных повреждений ДНК. Как правило, масса тела характеризуется высокой вариабельностью. В данном случае значения коэффициента

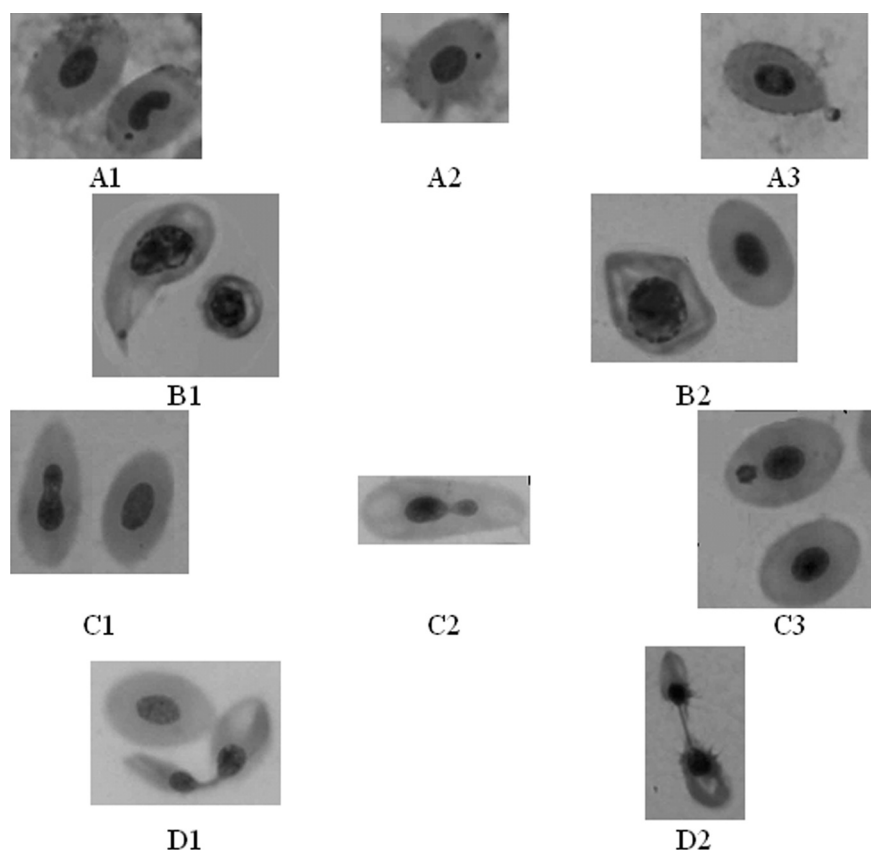
вариации этого признака соответствуют среднему уровню его изменчивости. По остальным показателям значения коэффициента вариации еще ниже и соответствуют низкому уровню изменчивости.

Таким образом, рассмотренные фенотипические показатели двухлеток изобелинской породы карпа характеризуются низким и средним коэффициентом вариации. Это указывает на отселективность и однородность изобелинской породы карпа по показателям телосложения.

Характер повреждений ДНК определяется процессами деградации темпов кроветворения с осеннего периода и выражается в некрозе «старых» дифференцированных эритроцитов, ядра которых являются функционально неактивными. К другим повреждениям ДНК можно отнести микроядра, которые в данный период, вероятно, являются остатками погибших менее дифференцированных эритроцитов.

Известно, что эритроциты пойкилотермных (с непостоянной температурой) животных могут существовать до года и более, а темпы обновления крови зависят от окружающих условий и адаптивных возможностей животных. В отношении окружающих условий главным фактором является нехватка кислорода, которая приводит к быстрой репопуляции эритроцитов.

Количество анализируемого материала тесно связано с сезоном исследования, поскольку он оказывает сильное влияние на степень проявления данных критериев. Дополнительную информацию о цитологических процессах можно получить при анализе других признаков (рисунков) нарушений ядра – основного носителя генетической информации. Процессы гибели в некоторых случаях могут ограничивать число видимых цитогенетических нарушений (клетки с микроядрами), в других могут являться следствием элиминации клеток с повреждениями ДНК. Среди цитогенетических процессов, происходящих на фоне естественных сезонных изменений



Цитогенетические повреждения в эритроцитах карпа в весенний период перед нерестом: A1–A3 – микроядра как результат потери целой хромосомы или ее фрагмента (A1 – микроядро в клетке с деформацией ядра, A3 – потеря клеткой микроядра); B1–B2 – полиплоидные эритроциты (B1 – потеря клеткой микроядра, подобно A3); C1–C3 – амитоз в эритроцитах (C3 – крупное микроядро или результат амитоза, или результат неравного кариокинеза); D1– D2 – амитоз на стадии цитокинеза

гематологических параметров карпа, можно отметить снижение к осени всех представленных на рисунке нарушений эритроцитов, в частности, полностью отсутствовали процессы амитоза (D1 и D2). Полученные данные указывают на прямое влияние сезонных гематологических качеств карпа на результат цитогенетического скрининга особей различных отводок.

По уровню повреждения ДНК на фоне естественной и индуцированной гормонами для нерестовой компании пролиферации клеток значительных различий не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 2. Цитогенетические характеристики повреждения ДНК особей карпов различных породных групп в зависимости от времени забора проб крови

| Отводка (породная группа) | n | Микроядра | | Повреждения ядра | |
|-------------------------------|----|-----------|-----------|------------------|-----------|
| | | мелкие | крупные | фрагментация | амитоз |
| <i>Весенне-летний период</i> | | | | | |
| Смесь чешуйчатая (чешуйчатая) | 12 | 2,92±0,57 | 0,25±0,13 | 1,58±0,43 | 0,08±0,08 |
| Столин XVIII (чешуйчатая) | 7 | 2,71±1,11 | 0,28±0,18 | 0,86±0,46 | 0,28±0,18 |
| Смесь зеркальная (зеркальная) | 11 | 1,55±0,69 | 0,27±0,14 | 3,18±0,44 | 0,27±0,14 |
| Три прим (зеркальная) | 13 | 2,92±0,87 | 0,31±0,17 | 1,38±0,37 | 0,23±0,12 |
| <i>Осенний период</i> | | | | | |
| Смесь чешуйчатая (чешуйчатая) | 19 | 0,01±0,01 | 0 | 0,49±0,16 | 0,04±0,02 |
| Столин XVIII (чешуйчатая) | 26 | 0,15±0,04 | 0,02±0,02 | 0,32±0,06 | 0 |
| Смесь зеркальная (зеркальная) | 6 | 0,03±0,03 | 0 | 0,47±0,24 | 0 |
| Три прим (зеркальная) | 18 | 0,08±0,04 | 0 | 0,18±0,06 | 0 |

На клетках крови карпов трех породных групп проанализировано цитогенетическое действие *in vivo* ДНК-повреждающего мутагена митомицина С в комбинации с предварительным введением бета-нафтофлавона. Установлено, что у каждой из изученных породных групп митомицин С повышал долю эритроцитов с микроядрами, в то время как предварительная обработка бета-нафтофлавоном уменьшала эффект промутагена. Этот результат свидетельствует о том, что в определенных условиях (например, сроки введения в организм) индукция ферментов метаболическая активация промутагенов может приводить не к увеличению, а к уменьшению цитогенетических повреждений в клеточных популяциях *in vivo*.

Наибольший уровень цитогенетических повреждений при воздействии мутагена отмечается у отводки «смесь зеркальная» (табл. 3), которая по данным Института рыбного хозяйства характеризуется меньшей жизнеспособностью. Метаболическая активация при обработке бета-нафтофлавоном не показала особых различий, что указывает на отсутствие отличий по генам детоксикации ксенобиотиков. Таким образом, дополнительное мутагенное воздействие *in vivo* позволяет выявлять различия между карпами различных породных групп.

Таблица 3. Цитогенетические характеристики повреждения ДНК особей карпа различных породных групп* при действии митомицина С и бета-нафтофлавона, летний период

| Отводка (породная группа) | Вариант опыта | Микроядра |
|---------------------------------|--|-----------|
| «Смесь чешуйчатая» (чешуйчатая) | Контроль | 0,21±0,11 |
| «Три прим» (зеркальная) | | 0,27±0,15 |
| «Смесь зеркальная» (зеркальная) | | 0,15±0,11 |
| «Смесь чешуйчатая» (чешуйчатая) | Митомицин (0,5 мг/кг) | 0,64±0,16 |
| «Три прим» (зеркальная) | | 0,70±0,19 |
| «Смесь зеркальная» (зеркальная) | | 1,34±0,16 |
| «Смесь чешуйчатая» (чешуйчатая) | Митомицин С (0,5 мг/кг) в комбинации с предварительным введением бета-нафтофлавона (40 мг/кг в течение 3 дней ежедневно) | 0,37±0,15 |
| «Три прим» (зеркальная) | | 0,50±0,20 |
| «Смесь зеркальная» (зеркальная) | | 0,67±0,23 |

* Исследовано по 5 рыб в каждом варианте.

Таблица 4. Аллельные частоты трансферрина у сеголеток разных отводок и породных групп изобелинской породы карпа

| Отводка (породная группа) | Частота аллелей | | | | | | | Доля гетерозигот, % |
|----------------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|
| | q ^A | q ^B | q ^C | q ^D | q ^Y | q ^Z | q ^X | |
| Смесь зеркальная (зеркальная) | 0,182 | 0,043 | 0,252 | 0,105 | 0,418 | – | – | 51,2 |
| Столин XVIII (чешуйчатая) | 0,346 | 0,255 | 0,156 | 0,053 | 0,185 | 0,005 | – | 67,3 |
| Смесь чешуйчатая (чешуйчатая) | 0,901 | 0,011 | 0,009 | 0,004 | 0,075 | – | – | 16,6 |
| Три прим (зеркальная) | 0,500 | 0,420 | 0,030 | – | 0,050 | – | – | 35,9 |

На основании проведенных в 2007 г. исследований установлено, что селекционная отводка изобелинского карпа «смесь зеркальная» маркирована по четырем аллелям трансферрина: Tf^A, Tf^B, Tf^D и Tf^Y (с доминированием Tf^Y), селекционная отводка «столин XVIII» – по аллелям Tf^A, Tf^B, Tf^D и Tf^Y, при этом обе отводки являются достаточно гетерогенными. В селекционной отводке «смесь чешуйчатая» выявлено увеличение гомогенности данной группы рыб и возрастание уровня инбредной депрессии. Гомогенностью по аллелям Tf^A и Tf^B отличается селекционная отводка «три прим». Повышенную встречаемость аллеля Tf^B в гомозиготном состоянии в популяции алтайского зеркального карпа российские исследователи связывают с его повышенной жизнеспособностью [8]. В 2008 г. существенных изменений в аллельных частотах трансферринов по сравнению с 2007 г. не было, отмечены лишь незначительные колебания частот исследуемых аллелей (табл. 4).

Трансферрин участвует *in vivo* в катализируемой железом реакции переноса O²⁻. Исследование регуляции этих плазматических белков является чрезвычайно важным для понимания работы защитной системы против свободных радикалов и перекисидации жиров. Доступность железа и регуляция его состояния в физиологических условиях зависят от состояния трансферрина. Он может защитить ткани от перекисидации жиров путем связывания железа и таким образом предотвратить его участие в реакции перекисидации. Однако антиоксидантная функция трансферрина в физиологическом круговороте представляет собой сложную проблему. При частичной насыщенности ионами железа трансферрин выступает в роли мощного антиоксиданта, связывая железо из плазмы и предотвращая перекисидацию липидов. Будучи полностью насыщенным, он может высвободить ионы железа в плазму и в таком случае становится прооксидантом. Детальное участие железосвязывающих белков, как участников вторичной системы защиты в физиологических условиях, до конца не ясно, поэтому требуются дальнейшие исследования в этой области. Таким образом, можно предположить связь между генетическим полиморфизмом по трансферринам в отводках карпа и их чувствительностью к свободнорадикальным механизмам и процессам старения.

Выводы

1. Индукция повреждений ДНК *in vivo* с помощью ДНК-повреждающего мутагена митомицина С позволяет выявить различия между селекционными группами изобелинской породы карпа по уровню микроядер в эритроцитах периферической крови цитогенетическим методом. В частности, наибольший уровень цитогенетических повреждений при воздействии мутагена (1,34±0,16) отмечается у отводки «смесь зеркальная», которая характеризуется меньшей жизнеспособностью.

2. Различие породных групп изобелинской породы карпа по аллелям трансферринов Tf^A, Tf^B, Tf^D и Tf^Y сохраняется в селекционных группах и может быть одной из причин разной чувствительности рыб к мутагенным факторам окружающей среды.

3. Цитогенетические и биохимические показатели периферической крови, такие как уровень микроядер и повреждений ядра, частота аллелей трансферрина, можно использовать в качестве комплексных критериев при паспортизации карпов белорусской селекции.

Работа выполнена в рамках задания 4.4.7 «Оценить генетическое разнообразие и создать эколого-генетические и молекулярно-биологические паспорта карпа белорусской селекции» ГП «Биотехнология».

Литература

1. Оценка токсичности лекарственных препаратов [Электрон. ресурс] / Лаборатория биомаркеров и биотестирования. – 27.09.2007. – Режим доступа: <http://www.celltest.kiev.ua>. – Дата доступа: 26.02.2010.
2. Arkhipchuk, V. V. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells / V. V. Arkhipchuk, N. N. Garanko // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2005. – Vol. 62. – N 1. – P. 42–52.
3. Пяткин, Е. К. Изучение аберраций хромосом в клетках костного мозга и лимфоцитах периферической крови у здоровых людей и больных злокачественными новообразованиями при остром радиационном воздействии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.05 / Е. К. Пяткин; Всесоюз. онколог. науч. центр АМН СССР. – М., 1974. – 32 с.
4. Севанькаев, А. В. Некоторые итоги цитогенетических исследований в связи с оценкой последствий Чернобыльской аварии / А. В. Севанькаев // *Радиационная биология. Радиозэкология.* – 2000. – Т. 40. – Вып. 5. – С. 589–595.
5. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н. Н. Ильинских [и др.]. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. – 272 с.
6. Savage, J. R. K. Acentric chromosomal fragments and micronuclei: the time displacement factor / J. R. K. Savage // *Mutat. Res.* – 1989. – Vol. 225. – N 4. – P. 171–173.
7. Nebert, D. W. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction / D. W. Nebert, A. Puga, V. Vasiliou // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1993. – Vol. 685. – N 6. – P. 624–640.
8. Пищенко, Е. В. Микроэволюционные процессы и популяционный гомеостаз алтайского зеркального карпа: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.02.01 / Е. В. Пищенко; Моск. гос. акад. вет. мед. и биотехн. им. К. И. Скрябина. – М., 2009. – 32 с.

S. E. DROMASHKO, E. V. TARAZEVIICH,
V. Yu. AFONIN, O. V. KVITKO, S. V. SAZANOV

SENSITIVITY OF VARIOUS BREED GROUPS OF CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.) TO EXOGENOUS DNA DAMAGES

Summary

The article deals with the sensitivity of a various (*Cyprinus carpio* L.) to exogenous DNA damages (by natural and technogenic factors). A difference in the level of micronuclei between the breed groups was found due to the *in vivo* induction of DNA damages in peripheral blood erythrocytes. It is permanent transfer in allelic polymorphism that can be at the bottom of different carp genome sensitivity to environmental mutagenic factors.