

УДК: 597.554.3.08

АНАЛИЗ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК КАРПОВЫХ РЫБ (*CYPRINUS CAPRIO* L.) НА ОСНОВЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

© 2016 Н.М. Абдуллаева, С.С. Гафурова

Дагестанский государственный университет, г. Махачкала

Статья поступила в редакцию 24.05.2016

В работе приводятся результаты сравнительного анализа общего количества эритроцитов и частоты встречаемости эритроидных клеток с микроядрами в периферической крови рыб семейства Карповые (*Cyprinus caprio* L.). Были установлены различия по частоте встречаемости микроядер между двумя исследуемыми группами рыб, обитающими в естественном и искусственном водоемах на территории Республики Дагестан. Высказано мнение о том, что сравнительный цитогенетический мониторинг рыбных ресурсов может способствовать накоплению подробной информации об экологической обстановке вод на территории Республики Дагестан.

Ключевые слова: рыба, кровь, эритроциты, микроядерный тест

В настоящее время отмечается глобальное загрязнение окружающей среды техногенными продуктами, которые, обладая повышенной мутагенной активностью, несут в себе опасность воздействия на генетический аппарат живых существ. Достаточно сильное влияние антропогенных экологических факторов различной природы испытывают на себе водные экосистемы [1]. Химический мониторинг загрязнения водных экосистем является недостаточно информативным для биологов. Несмотря на быстроту и точность физико-химических исследований, нельзя оценить полностью эффекты и последствия влияния загрязнений. По данной причине биологические индикаторы, по наличию и состоянию которых можно судить о естественных и антропогенных изменениях в среде, предоставляют большую информацию [11]. Многие авторы сходятся во мнении, что различные виды рыб могут служить надежными биоиндикаторами при диагностике состояния водных экосистем [4]. Рыбы считаются наиболее адекватным объектом, поскольку имеют способность метаболизировать и накапливать содержащиеся в воде химические соединения [9]. Кровеносная система рыб чутко реагирует на изменение факторов водной среды. Хроническое воздействие неблагоприятных факторов ведёт к нарушению цитогенетической стабильности и накоплению хромосомных аномалий в клетках организма, и наиболее ярким показателем данного воздействия можно считать увеличение количества микроядер в клетке.

Микроядра – ДНК-содержащие тельца, включающие в себя как из ацентрические фрагменты хромосом, так и отдельные целые хромосомы, отставшие в анафазе или телофазе митоза от веретена деления и не вошедшие в дочерние ядра и существующие в клетке отдельно от основного ядра или связанные с ними хроматиновым мостом [6]. В зависимости от числа обнаруженных микроядерных структур можно говорить о степени загрязнения среды обитания. Наряду с микроядрами в клетках можно наблюдать другие кариологические патологии клетки: хроматонолиз, кариорексис, кариолизис, ядра-кольца и др. [7]. Разработка систем контроля состояния генома рыбных ресурсов при действии различных токсикантов играет важную роль для решения экологических проблем. Регистрация клеток, имеющих в своем составе микроядра, является

практически значимым и высокоинформативным показателем, отражающим действие различных факторов, позволяющим диагностировать воспалительные процессы и осуществлять их контроль и коррекцию [12].

Цель исследования: анализ частоты возникновения микроядер в эритроидных клетках периферической крови рыб.

В работе представлены результаты сравнительного цитогенетического анализа, характеризующие уровни хромосомных мутаций в эритроцитах периферической крови рыб, обитающих в естественном и искусственном водоемах Республики Дагестан. Для более адекватной оценки данных цитогенетического анализа, нами был произведен гематологический анализ красной крови исследуемых рыб.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований послужили рыбы семейства карповых (*Cyprinus caprio* L.): карась обыкновенный (*Carassius carassius*), выловленный из естественного (устье реки Сулак) и искусственного (Брянский рыбзавод) водоемов в весенний период времени 2016 г., массой 30–40 г, в возрасте от 4 до 5 месяцев. Особи рыб для анализа не имели видимых внешних повреждений. Объем каждой выборки составил – по 7 особей.

Периферическую кровь отбирали прижизненно из хвостовой вены. Для подсчета общего количества эритроцитов использовали камеру Бюркера с выгравированной на ней сеткой Горяева. Подсчет эритроцитов производили в 80 малых квадратах, расположенных по диагонали. Для подсчета клеток использовали 2–3 капли раствора крови. Кровь набирали с использованием смесителя для эритроцитов и предварительно смешивали 0,65% раствором NaCl. Считали все клетки, лежащие не только внутри самого квадрата, но и на его пограничных линиях, если большая часть клетки приходилась на внутреннюю часть квадрата. Среднее количество эритроидных клеток определяли следующим образом: число всех подсчитанных клеток делили на число квадратов, в которых подсчитывали эритроциты (80) и получали значение, соответствующее среднему количеству клеток, содержащемуся в $1/4000 \text{ мм}^3$. Умножив полученный результат на 4000 и на степень разведения, мы получали среднее содержание эритроцитов 1 мм^3 [6].

Определение уровней хромосомных мутаций в эритроцитах рыб проводили с помощью метода учета микроядер, используемого в исследованиях проблем эко-токсикологии. На препаратах крови рыб подсчитывали

Абдуллаева Наида Муртазалиевна, кандидат биологических наук, доцент. E-mail: casa1@yandex.ru
Гафурова Саида Сагидовна, студентка

число нормальных эритроцитов, а также число эритроцитов, содержащих микроядра и ядерный материал, не оформленный в четкое микроядро, отнесенное к общему количеству просмотренных клеток. С каждой пробы крови рыб просматривалось по 1000 эритроцитов. Сравнение частот микроядер у рыб исследуемых водоемов проводилось на основании анализа 10000 эритроцитов в каждой выборке. При проведении микроядерного теста были использованы мазки крови рыб. Для приготовления препаратов микроядер проводили кислотный гидролиз в 5н HCl при температуре 37°C в течение 11 мин. После гидролиза препараты отмывали в дистиллированной воде в течение 1–2 мин. Отмытые препараты окрашивали в реактиве Шиффа в течение 1 часа при комнатной температуре. После окрашивания препараты отмывали в двух сменах свежеприготовленной сернистой воды по 10 мин в каждой, а затем в проточной воде в течение 5 мин. Обезвреживание препаратов проводили в серии спиртов восходящей концентрации (30, 50, 70 и 96°). После этого препараты заключали в канадский бальзам. Окрашенные таким образом препараты подвергали цитогенетическому

анализу. Мазки просматривались под микроскопом со встроенным видеоокуляром ТоурСам (увеличение 100×). Число генетически-абerrантных клеток выражали в промилле (‰). Статистическую обработку результатов проводили методом малой выборки по t-критерию Стьюдента с использованием пакетов прикладных программ для персональных компьютеров Microsoft Excel STATISTICA 12 [10]. Различия полагали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$ и ниже.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены результаты, характеризующие общее количество эритроцитов в крови исследуемых рыб. В ходе проведенного анализа гематологических показателей красного ряда крови рыб нами было установлено, что в среднем количество эритроцитов у карася обыкновенного (*Carassius carassius*) из естественного водоема составило 0,72 млн./мкл. У рыб из искусственного водоема показатели общего количества эритроидных клеток были несколько снижены и составили 0,48 млн./мкл. Согласно литературным данным [2], общее количество эритроцитов у рыб Семейства карповых (*Cyprinus caprio* L.) в норме составляет диапазон 0,5–2,0 млн/мкл.

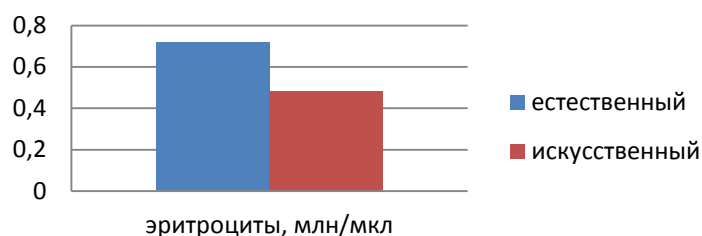


Рис. 1. Общее количество эритроцитов карповых из естественного и искусственного водоемов.

Цитогенетический анализ показал наличие микроядер в эритроидных клетках рыб, обитающих в естественных и искусственных водоемах. Содержание абerrантных клеток с микроядрами у рыб, согласно полученным нами данным, находилось в пределах нормы (табл. 1). Доля эритроцитов с микроядрами у карася обыкновенного (*Carassius carassius*), обитающего в естественных водоемах (устье реки Сулак) несколько превышала значения, указанные в литературных данных [8], согласно которым в норме частота встречаемости клеток с микроядрами при спонтанном мутагенезе равна 0,5–1‰ и составила $1,2 \pm 0,21$ ‰. Данные показатели свидетельствуют о начальных развивающихся патологических процессов в кроветворных клетках рыб. Вероятно, наблюдаемая картина у рыб связана с негативным действием на организм комплексных факторов в природных условиях, включая эколого-географические (соленость, температуры воды и др.). Наличие микроядерных структур, в то же время, может представлять собой проявление реализации компенсаторно-приспособительных процессов, под действием повреждающих факторов [7]. На препаратах периферической крови в эритроцитах карася, содержащихся в искусственных условиях, наблюдался низкий уровень «микроядерности» клеток, в среднем составляющий $0,3 \pm 0,05$ ‰.

В анализируемом материале в большинстве случаев встречались эритроциты с мелкими микроядрами. При исследовании эритроцитов в периферической крови у рыб из искусственных водоемов, наряду с микроядрами наблюдались и другие ярко выраженные деструктивные изменения клеток, отличающихся степенью проявления патоморфологических нарушений.

Таблица 1. Показания частот встречаемости микроядер в эритроцитах рыб семейства Карповых ($M \pm m$, $n=7$)

Карась (<i>Carassius carassius</i>)	Число проанализированных эритроцитов	Частота клеток с микроядрами, ‰
Брянский рыбзавод	1000	$0,3 \pm 0,05$
Устье реки Сулак	1000	$1,2 \pm 0,21$

На препаратах достаточно хорошо просматривались эритроидные клетки. В клетках периферической крови наблюдались крупные формы рыхлые, неравномерно окрашенные ядра, с контрастным соотношением к цитоплазме, которая не окрашена, прозрачна, разделена контуром мембраны (местами расплывчата) эритроцита от гиалоплазмы. Мембраны ядер нечетки, наблюдается деструкция цитоплазмы некоторых эритроидных клеток, с последующей ее гибелью. При изучении морфологии эритроцитов были обнаружены клетки с амитозом различных типов: деление вытянутого гантелевидного ядра и образование нескольких насечек на мембране ядра (рис. 2).

Опираясь на полученные данные относительно общего количества эритроцитов, можно высказать предположение, что низкий уровень «микроядерности» у рыб с Брянского рыбзавода связан с усиленным выходом эритроидных клеток из кровяного русла. Из литературных источников известно, что канцерогены помимо генотоксических эффектов могут вызывать преждевременную элиминацию большого числа поврежденных клеток, связанную с запуском к клетке свободно-радикальных процессов. Это говорит о том, что при высоких концентрациях мутагенов химической

природы сильные цитотоксические эффекты могут перекрывать генотоксические воздействия. О чем, возможно, свидетельствуют полученные показатели крови карася из искусственного водоема. Согласно литературным данным, процесс спонтанных генетических нарушений в клетках рыб может стать причиной снижения воспроизводительных способностей рыб и уменьшать эффективность мероприятий, направленных на восстановление биологических ресурсов внутренних водоемов [3].

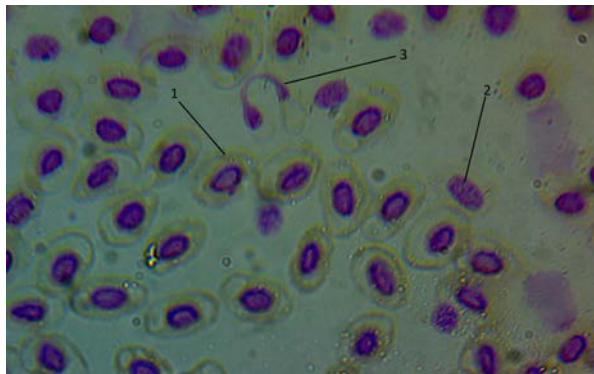


Рис. 2. Эритроциты периферической крови карася из искусственного водоемов ($\times 100$):

1 – эритроцит с микроядром, 2 – ядро с рыхлым хроматином, клетка, претерпевшая амитотическое деление

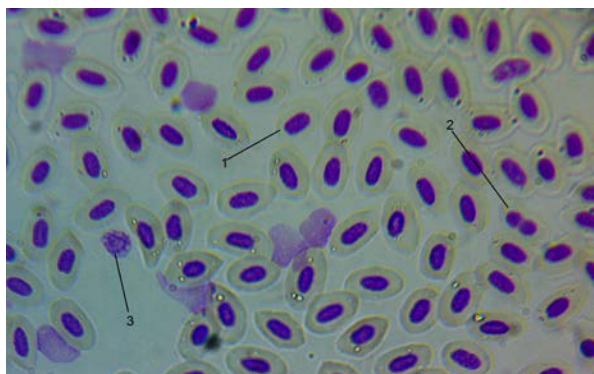


Рис. 3. Эритроциты периферической крови карася из естественного водоема ($\times 100$):

1 – эритроцит в норме; 2 – амитоз в клетке эритроцита; 3 – конгломерат разрушенного эритроцита

При исследовании морфологии эритроидных клеток карася обыкновенного (*Carassius carassius*), выловленного из устья реки Сулак, наблюдались незначительные изменения в клетках. Контуров клеток довольно четкие, ядра правильной эллипсоидной формы, границы ядер клеток четко различимы (рис. 3). Сравнительный цитогенетический анализ эритроцитов периферической крови выявил существенные различия, как в показателях общего количества эритроцитов, так и в полученных данных цитогенетического анализа у рыб из естественных и искусственных водоемов РД. В большинстве случаев у исследованных видов рыб частоты хромосомно-аномальных эритроцитов относительно низки. Количество эритроидных клеток с микроядрами, согласно полученным нами данным, превалировало у рыб, обитающих в устье реки Сулак, в то время как у рыб из искусственного водоема этот показатель достигал значений, наблюдаемых при норме. Однако как полученные значения относительно

общего числа эритроцитов, так и их морфология у рыб с Брянского рыбзавода не позволяют дать заключение, о благоприятном состоянии организма, а, напротив, свидетельствуют о развивающихся возможно серьезных дегенеративных изменениях в эритроцитах периферической крови рыб. Очевидна необходимость дальнейших сравнительных цитогенетических исследований, поскольку эти исследования способствуют накоплению более подробной информации, относительно экологического состояния вод на территории Республики Дагестан. Представленные данные могут служить фоновыми показателями при генетическом скрининге рыбных ресурсов с целью регистрации экологического состояния вод на территории Республики Дагестан.

Выводы:

1. В периферической крови карповых, общее количество эритроцитов у рыб, обитающих в естественном водоеме, соответствует нормативным показателям, а у рыб из искусственного водоема этот показатель значительно снижен на 32%.

2. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами была выше у карася обыкновенного (*Carassius carassius*), обитающего в естественных условиях в устье реки Сулак и составила $1,2 \pm 0,21$, нежели у рыб, выловленных на территории Брянского рыбзавода – $0,3 \pm 0,05$.

3. Выявлены деструктивные изменения в морфологии эритроцитов в обеих исследуемых группах, которые наиболее выражены у рыб, обитающих в искусственном водоеме (Брянский рыбзавод). У рыб из естественного водоема (устье реки Сулак) эти изменения были незначительны и менее выражены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Арабаджи, А.А. Использование микроядерного теста для экологической оценки водоемов орловской области / А.А. Арабаджи, В.И. Крюков // Проблемы развития АПК Орловской области. матер. конф. мол. ученых и спец. ф-та биотехнологии и ветеринарной медицины ОрелГАУ, 11-12 мая 2006 г. – Орел: Издательство ОрелГАУ, 2006. С. 6-10.
2. Ахметова, В.В. Оценка морфологической и биохимической картины крови карповых рыб, выращиваемых в ООО «Рыбхоз» Ульяновского района ульяновской области / В.В. Ахметова, С.Б. Басина // Вестник Ульяновской ГСХА. 2015. №3 (31). С. 55.
3. Захидов, С.Т. Цитогенетическое изучение кроветворных клеток рыб из водоемов норило-пясинской водной системы (Таймыр) / С.Т. Захидов, Ю.В. Чеботарева, К.А. Савватова, В.А. Максимов // Известия РАН. Серия биологическая. 1996. №1. С. 10-15.
4. Захидов, С.Т. Цитогенетический мониторинг Волжского бассейна. Уровни хромосомных мутаций в половых и соматических клетках самцов стерляди / С.Т. Захидов, М.И. Карпук, В.А. Голиченков // Известия РАН. Серия биологическая. 1993. №1. С. 102-107.
5. Иванова, Т.Н. Некоторые аспекты к основам ихтиогематологии. – Ростов-на-Дону: РГПУ. 2002. С. 54
6. Колмакова, Т.С. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей: метод. рекомендации / Т.С. Колмакова, С.Н. Белик, Е.В. Моргуль, А.В. Севрюков. – Ростов-на-Дону: Изд-во РостГМУ, 2013. С. 31.
7. Кузина, Т.В. Изменения структуры ядра эритроцитов периферической крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала // Вестн. Моск. гос. обл. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. №2. С. 50-57.
8. Новицкий, В.В. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Монография. – Изд-во Том. ун-та, 1992. 272 с.

9. Оганесян, Г.Г. Оценка повреждений ДНК в эритроцитах рыб из разных водоемов Армении методом ДНК-комет / Г.Г. Оганесян, А.Э. Симонян, Б.К. Габриелян и др. // Биологический журнал Армении. 2012. Т. 64. №4. С. 64-70.
10. Трухачева, Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. – М.: – ГЭОТАР-Медиа, 2012. 384 с.
11. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique // Mutation Research. 2000. № 455. P. 81-95.
12. Fabre, T. Polymorphonuclear cell apoptosis in exudates generated by polymers / T. Fabre, F. Belloc, B. Dupuy et al. // J. Biomed. Mater. Res. 1999. V. 44. № 4. P. 429-435.

ANALYSIS OF ERYTHROID CELLS IN CARP (*CYPRINUS CAPRIO* L.) ON THE BASIS OF MICRONUCLEUS TEST

© 2016 N.M. Abdullaeva, S.S. Gafurova

Dagestan state University, Makhachkala

In paper it provides a comparative analysis of the total number of erythrocytes and the frequency of erythroid cells with micronuclei occurrence in the peripheral blood of the fish family Cyprinidae (*Cyprinus caprio* L.). It were determined the differences in frequency of erythroid cells with micronuclei occurrence between the two investigated groups of fishes: living in natural and artificial reservoirs (waters) on the territory of Dagestan Republic. It was expressed the opinion that comparative cytogenetic monitoring of fishery resources can contribute to the accumulation of information about the ecological situation of waters in the territory of Dagestan Republic.

Key words: *fish, blood, erythrocytes, micronuclei test*