

УДК: 631.95:575.17:639.3

ЦИТОГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКИХ КОРОПІВ З РІЗНИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ

Ю. М. Глушко, С. І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААН України
НАУ Інститут міського господарства факультет екологічної безпеки
кафедра біотехнології

Виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності цитогенетичних аномалій (еритроцитів і лейкоцитів із мікроядрами, двоядерних лейкоцитів, апоптозів) у клітинах периферійної крові рамчастого та лускатого коропів з чотирьох рибних господарств різних еколого-географічних регіонів України. Досліджувані групи риб, які фенотипово належать до різних порід, але відтворюються в одному і тому ж господарстві, відрізняються одна від одної за такими характеристиками дестабілізації хромосомного апарату, як частота зустрічальності еритроцитів та лейкоцитів з мікроядрами, двоядерних лейкоцитів та апоптозів.

Ключові слова: ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ, ПОПУЛЯЦІЯ, МІКРОЯДЕРНИЙ ТЕСТ, ХРОМОСОМНИЙ АПАРАТ, МІКРОЯДРА, ЛУСКАТА ПОРОДА КОРОПА, РАМЧАСТА ПОРОДА КОРОПА, ГЕНОТОКСИНИ, ЦИТОТОКСИНИ, ЕКОЛОГІЯ

На сучасному етапі розвитку вітчизняного рибництва постає потреба пошуку нових екологічно виправданих підходів ведення рибного господарства [1]. На екологічний стан господарств суттєво впливають якість води джерел водопостачання, а також інтенсифікаційні заходи, які застосовуються в рибництві. У ставах на протязі вегетаційного періоду накопичуються органічні речовини та біогенні елементи за рахунок відмирання водної рослинності, внесення кормів та органічних добрив [2].

Погіршення умов навколишнього середовища призводить до накопичення у ньому мутагенів. Ця ситуація вимагає проведення оцінки стабільності генетичного апарату риб для біоіндикації генотоксичного, цитотоксичного забруднення води і, відповідно, прогнозу впливу на їх популяційно-генетичну структуру негативних факторів навколишнього середовища [3].

Комплексний підхід на організаційному рівні широко використовується в різних країнах. Базисний набір тест-організмів для біомоніторингу вод різноманітних типів традиційно включає представників мікроорганізмів, водоростей, безхребетних і хребетних тварин. В європейських країнах, наприклад, у Великобританії, первинний скринінг проводять з використанням бактерій (*Microtox-test*) і рачків *Daphnia*. Подальше тестування проводять з водоростю *Selenastrum*, а також з лососевими та корошовими рибами [4].

До одного з них належить оцінка і контроль стабільності генетичного апарату риб у залежності від породної належності, а також умов розведення в різних господарствах, оскільки риба зазвичай реагує на токсиканти подібно до вищих хребетних [5].

Як показники дестабілізації хромосомного апарату риб використовують мікроядерний тест у еритроцитах, лейкоцитах і оцінку дефектів морфології ядер клітин крові, а також частоти зустрічальності двоядерних клітин та апаптозів. Набір клітинних критеріїв включає в себе відсоток клітин з мікроядрами (реєструють структурні порушення в спадковому апараті клітини) і кількісні характеристики ядерець (відображають функціональні зміни) [5, 6]. Такий аналіз необхідний для контролю і прогнозу впливу на популяційну структуру ставових риб умов вирощування та селекційної роботи.

Матеріали і методи

З метою оцінки цих аномалій було проведено дослідження української рамчастої та лускатої порід коропа з ВАТ «Черкасирибгосп», ВАТ «Хмельницькрибгосп», ВАТ «Херсонрибгосп», ДПДГ «Нивка».

Українська рамчаста порода є найбільш продуктивною серед усіх українських малолускатих форм. У процесі створення породи використано метод відтворювального схрещування малолускатого і лускатого коропів галицького походження з наступною селекцією рамчастих форм у сприятливих умовах розведення. Ареал коропів української рамчастої породи сягає більшості рибокомбінатів та інших рибогосподарських підприємств, особливо в центральних і південних районах України. Вважають, що за генотипом рамчасті коропи мають 50 % спадкових ознак малолускатих та 50 % лускатих коропів. Вони є найбільше продуктивними і витривалими щодо умов існування серед дзеркальних і голих коропів. Цей короп відноситься до відгодівельного типу [7].

Українська луската порода коропа створена методом відтворювального схрещування малолускатих і лускатих коропів галицького походження з наступною селекцією лускатих форм на фоні сприятливих умов утримання. Коропи цієї породи культивуються у степовій, лісостеповій і частково поліській ґрунтово-кліматичних зонах України. Генотип української лускатої породи складається із 50 % спадкових ознак лускатого і 50 % дзеркального галицького коропа. Цей короп має високу пошукову здатність, тому його більше використовують при екстенсивному (випасному) господарюванні [7].

З метою оцінки інформативності різних характеристик дестабілізації хромосомного апарату, в дослідженні було виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності низки цитогенетичних аномалій в еритроцитах і лейкоцитах периферійної крові рамчастої та лускатої порід коропа. Дослідний матеріал відбирали в кількості 15 особин у кожній групі з чотирьох рибних господарств, таких як: ВАТ «Черкасирибгосп» Черкаської обл., ВАТ «Хмельницькрибгосп» Хмельницької обл., ВАТ «Херсонрибгосп» Херсонської обл., ДПДГ «Нивка» Київської обл.

У риб брали краплю периферійної крові, розводили фізіологічним розчином (1:1) і на предметних скельцях готували мазки. Мазки фіксували метиловим спиртом і висушували за кімнатної температури, потім проводили фарбування за методом Романовського стандартним барвником Гімза [3]. Мазки витримували 30–40 хвилин у барвнику (5 мл стандартного розчину Гімза і 20 мл дистильованої води з рН 6,8–7,2). Ополіскували водопровідною водою, висушували на повітрі. Для аналізу клітин використовували бінокулярний мікроскоп *Primo Star Zeiss* при збільшенні у 1000 разів.

У мазках крові підраховували частоту еритроцитів із мікроядрами (ЕМЯ), одноподібних лейкоцитів із мікроядрами (ЛМЯ), двоядерних лейкоцитів (ЛД) не менше ніж у 3000 клітин. Одержані результати виражали в проміле ‰ [8]. Статистичну вірогідність відмінностей частот зустрічальності цитогенетичних аномалій між групами тварин оцінювали за критерієм Стьюдента (*t*_s) [8].

Результати й обговорення

У мазках крові ядерні еритроцити відносно невеликого розміру з щільними, компактними ядрами овальної форми та яскраво вираженою цитоплазмою. Дана особливість допомогла легко їх відрізнити і проводити в клітинах підрахунок мікроядер окремо для кожної групи клітин. Також легко типувалися і двоядерні лейкоцити, відносно підвищена частота яких у клітинах периферичної крові відображає порушення в проходженні кінцевої стадії мітотичного поділу, цитокінезу. Мікроядра — невеликі округлі тільця, які формуються при конденсації ацентричних хромосомних фрагментів або цілих хромосом, які не були включені в основне ядро по закінченню мітотичного поділу клітини [9].

Формування мікроядер може бути обумовлено порушенням різних клітинних механізмів. Так, мікроядра, які включають хромосомні фрагменти, утворюються після прямих розривів ланцюга ДНК, реплікації на пошкодженій ДНК-основі, репресії синтезу ДНК (кластогенні пошкодження). Мікроядра, що включають цілі хромосоми утворюються в наслідок порушень веретена поділу, кінетохора, або інших частин мітотичного апарату. Відповідно підвищена частота клітин з мікроядрами є біомаркером генотоксичних ефектів, які можуть виникнути в наслідок впливу кластогенних або анеугенних агентів [10]. Ще одним важливим етапом цитодиференціації клітин багатоклітинних організмів є апоптоз, частоти виникнення якого також обраховувалися. Результати підрахунку клітин із цитогенетичними аномаліями у двох досліджуваних групах коропа рибного господарства ВАТ «Черкасирибгосп» Черкаської обл. наведено у (табл. 1).

Таблиця 1

Значення частот зустрічальності різних цитогенетичних аномалій у клітинах периферійної крові двох груп коропа рибного господарства ВАТ «Черкасирибгосп»

Порода коропа	Кількість особин	ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптоз
Українська рамчаста порода коропа	15	3,8±0,4	1,4±0,2	3,7±0,6	2,2±0,2
Українська луската порода коропа	15	2,5±0,4	1,4±0,2	1,8±0,2	1,1±0,2

Виявлено, що менші значення частот зустрічальності еритроцитів з мікроядрами (2,5±0,4%) та двоядерних лейкоцитів (1,8±0,2%) у групі лускатого коропа. Частоти зустрічальності лейкоцитів з мікроядрами у групах знаходилися на одному рівні (1,4±0,2%). Значення частот зустрічальності апатозів у групі рамчастого коропа вища (2,2±0,2%) порівняно з лускатим (1,1±0,2%). Статистично вірогідні відмінності спостерігалися у двох груп українських коропів за частотами зустрічальності еритроцитів з мікроядрами ($P < 0,05$; $t_s = 2,3$), двоядерних лейкоцитів ($P < 0,01$; $t_s = 3$) та апоптозів ($P < 0,01$; $t_s = 4,1$).

Результати підрахунку клітин із цитогенетичними аномаліями у двох досліджуваних групах коропа рибного господарства ВАТ «Хмельницькрибгосп» наведено у (табл. 2).

Таблиця 2

Значення частот зустрічальності різних цитогенетичних аномалій у клітинах периферійної крові двох груп коропа рибного господарства ВАТ «Хмельницькрибгосп» Хмельницької обл.

Порода коропа	Кількість особин	ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптоз
Українська рамчаста порода коропа	15	5,5±0,5	1,1±0,2	2,7±0,7	2,1±0,4
Українська луската порода коропа	15	1,4±0,3	0,8±0,2	1,4±0,5	0,7±0,1

Виявлено, що менші значення частот зустрічальності еритроцитів з мікроядрами ($1,4 \pm 0,3 \%$), лейкоцитів з мікроядрами ($0,8 \pm 0,2 \%$) та двоядерних лейкоцитів ($1,4 \pm 0,5 \%$) у групі лускатого коропа. Значення частот зустрічальності апаптозів у групі лускатого коропа також нищі ($0,7 \pm 0,1 \%$) порівняно з рамчастим ($2,1 \pm 0,2 \%$). Статистично вірогідні відмінності спостерігалися у двох груп українських коропів за частотами зустрічальності еритроцитів з мікроядрами ($P < 0,001$; $t_s = 4,1$) та апоптозів ($P < 0,01$; $t_s = 3,0$).

Результати підрахунку клітин із цитогенетичними аномаліями у групах лускатого коропа з трьох різних господарств наведено у (табл. 3).

Таблиця 3

Значення частот зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах периферійної крові лускатого коропа різних господарств

Порода коропа	Кількість особин	ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптоз
Українська луската порода коропа (ВАТ «Херсонрибгосп»)	15	$0,9 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1$
Українська луската порода коропа (ВАТ «Хмельницькрибгосп»)	16	$1,4 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1$
Українська луската порода коропа (ДСГ «Нивка»)	16	$1,2 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$

Результати досліджень показали, що в трьох групах лускатого коропа найбільші значення частот зустрічальності еритроцитів з мікроядрами ($1,4 \pm 0,3 \%$) та лейкоцитів з мікроядрами ($0,8 \pm 0,2 \%$) виявлено у групі лускатого коропа рибного господарства ВАТ «Хмельницькрибгосп». Частоти зустрічальності двоядерних лейкоцитів ($1,9 \pm 0,5 \%$) найвища у групі лускатого коропа рибного господарства ВАТ «Херсонрибгосп». Статистично вірогідних відмінностей у трьох груп українського лускатого коропа за частотами зустрічальності ЕМЯ, ЛМЯ, ДЛ та апоптозів не спостерігали.

Висновки

Загалом, одержані результати свідчать, що хромосомний апарат коропа за дослідженими цитогенетичними характеристиками у клітинах периферійної крові виявився більш стабільним у групах лускатого коропа порівняно з рамчастим. Також було встановлено, що в трьох групах лускатого коропа, які фенотипово належать до одного внутрішньопорідного типу, але відтворюються в різних господарствах, відрізняються одна від одної за цитогенетичними характеристиками, такими як: ЕМЯ, ЛМЯ, ДЛ та апоптози. Даний факт наглядно демонструє вплив екологічного стану водойм на частоти виникнення цитогенетичних аномалій і відповідно, стабільність хромосомного апарату коропа.

Перспективи подальших досліджень. З метою отримання об'єктивної і оперативної оцінки якості природних вод за допомогою методів біотестування необхідно використовувати комплексний підхід, тобто проводити дослідження як на рівні організму так і на рівні його клітин. Тому, на майбутнє, як тест-організми планується використання мікроорганізмів, безхребетних та хребетних тварин. Для отримання достовірних результатів цитогенетичних аномалій доцільно використовувати різновікові групи рамчастої та лускатої порід коропа, які відтворюються в різних господарствах.

Yu. Glushko, S. Tarasyuk

CYTOGENETIC CHARACTERISTIC OF THE UKRAINIAN CARPS FROM DIFFERENT REGIONS OF UKRAINE

Summary

The analysis of occurrence frequency of cytogenetic anomalies (erythrocytes with micronucleus, leukocytes with micronucleus, binucleated leukocytes and apoptosis) in the blood cells of scaly carp and frame carp from four fish economy of different ecological geographical regions of Ukraine has been carried out. The investigated groups of fishes which phenotypically belong to various intra-breed types, but are grown in the same economy are differed one from another by such characteristics of chromosomal apparatus destabilization on as occurrence frequency of erythrocytes with micronucleus, leukocytes with micronucleus, binuclear leukocytes and apoptosis.

Ю. М. Глушко, С. И. Тарасюк

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАИНСКИХ КАРПОВ С РАЗНЫХ РЕГИОНОВ УКРАИНЫ

Аннотация

Выполнено сравнительный анализ частот встречаемости цитогенетических аномалий (эритроцитов и лейкоцитов с микроядрами, двоядерных лейкоцитов, апоптозов) в клетках периферической крови рамчатого и чешуйчатого карпов с четырех рыбных хозяйств разных эколого-географических регионов Украины. Исследуемые группы рыб, которые фенотипически принадлежат к разным породам, но воспроизводятся в одном и том же хозяйстве, отличаются одна от другой за такими характеристиками дестабилизации хромосомного аппарата, как частота встречаемости эритроцитов и лейкоцитов с микроядрами, двоядерных лейкоцитов и апоптозов.

1. *Пилипенко Ю. В.* Екологія малих водосховищ Степу України : монографія / Ю. В. Пилипенко. — Херсон : Олді-плюс, 2007. — 303 с.

2. Гидробиологические проблемы внутренних водоемов Украины : Сб. науч. тр./ Отв. ред. О. Арсан ; АН Украины. Институт гидробиологии. — К. : Наукова думка, 1999. — 236 с.

3. *Стойка Ю. О.* Розробка прижиттєвого мікроядерного тесту на рибах / Ю. О. Стойка, Н. М. Гаранько, В. В. Архипчук // Гідроекологія : наукові записки. — 2001. — № 4. — С. 15–16.

4. *Al-Sabti K.* Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water / Al-Sabti K. // Mutation Res. — 1195. — Vol. 343. — P. 121–135.

5. *Cavas T.* Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes / Cavas T., Garanko N. N., Arkhipchuk V. V. // Food Chem. Toxicol. — 2005. — Vol. 43(4). — P. 569–574.

6. *Есауленко А. В.* Цитогенетическое изучение кроветворных клеток рыб Каспийского бассейна / А. В. Есауленко, Г. П. Косякова // Актуальные проблемы генетики : материалы 2-й конференции МОГиС. — Москва, 2003. — С. 341–342.

7. *Шерман І. М.* Розведення і селекція риб / І. М. Шерман., М. В. Гринжевський, І. І. Грициняк. — К. : «БМТ», 1999. — 238 с.

8. *Плохинский Н. А.* Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. — М. : «Колос», 1970. — 256 с.

9. *Albertini K. J.* Mutation Res. / Albertini K. J., Anderson D., Douglas G. K. — 2000. — 463. — P. 111–172.

10. *Heddle J. A.* Environmental Molecular Mutagenesis / Heddle J. A., Cimino M. C., Hayashi M. — 1991. — 18. — P. 277–291.

Рецензент: кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Інституту рибного господарства НААН України, О. В. Городна