

УДК 574.64:591.111:597.2/.5

А. А. Солдатов, Е. В. Пашкова, Т. А. Кухарева

**МИКРОЯДЕРНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ
БЫЧКА-КРУГЛЯКА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ
ЭРИТРОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

Исследована зависимость между содержанием микроядерных включений в зрелых эритроцитах бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pallas) и интенсивностью эритропоэтических процессов в его кроветворной ткани. Показано, что пролиферативная активность эритроидного ростка кроветворения у этого вида возрастает по мере приближения его организма к состоянию нереста: переход от III—IV к V и VI—II стадиям зрелости гонад. Об этом свидетельствует рост содержания в крови рыб малодифференцированных эритроидных форм: базофильных и полихроматофильных нормобластов. Одновременно в кровяном русле повышается содержание зрелых эритроцитов с микроядерными включениями. Между этими процессами установлена выраженная корреляционная связь ($R^2 = 0,995$). Это означает, что высокая пролиферативная активность тканей допускает увеличение доли повреждений ДНК, частным вариантом которых и является образование микроядер в клетке. Отсюда следует, что применение микроядерного теста на практике при оценке степени генотоксичности водной среды требует учета естественных состояний организма.

Ключевые слова: микроядерный тест, эритроциты, эритропоэз, нерест, *Neogobius melanostomus*.

Микроядра являются фрагментом клеточного ядра. Они не содержат полный геном. Образуются в период кариокинеза из участков хромосом лишенных центромер [3]. Представляют собой патологическое образование. Учет числа клеток с микроядрами лежит в основе микроядерного теста. Он используется в цитогенетических исследованиях при оценке генотоксичности водной среды [3, 9]. Ядерные эритроциты костистых рыб в этом отношении являются наиболее популярным объектом исследований [1, 2]. Однако показано, что доля повреждений ДНК существенно выше в тканях с интенсивной пролиферативной активностью (эффект нестабильности генома) [4, 13]. Это означает, что показания микроядерного теста могут быть не всегда адекватны условиям среды, а отражать динамику естественного состояния организма.

Известно, что эритропоэтические процессы в кроветворной ткани рыб протекают нерегулярно. Активная продукция эритроцитов наблюдается в постнерестовый период в течение 3—4 месяцев [6, 8]. В остальное время

© Солдатов А. А., Пашкова Е. В., Кухарева Т. А., 2012

кроветворная ткань выключена из активного функционирования. Это состояние является удобным для проверки эффективности микроядерного теста. В качестве объекта исследований целесообразен выбор порционно нерестящихся видов рыб. В этом случае при отлове одновременно можно получать особей в преднерестовом, нерестовом и постнерестовом состояниях, которым свойственны различные темпы пролиферативной активности малодифференцированных эритроидных клеток (проэритробластов) в очагах эритропоэза.

Цель работы — изучить связь между содержанием эритроцитов с микроядерными включениями в цитоплазме и числом незрелых эритроидных форм в циркулирующей крови.

Материал и методика исследований. Работа выполнена на взрослых особях бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pallas) в преднерестовом (III—IV стадия зрелости гонад), нерестовом (V стадия зрелости гонад) и постнерестовом (VI—II стадия зрелости гонад) состоянии: длина тела — 14—17 см, масса тела — 30—45 г. Рыб отлавливали в Севастопольской бухте в июле. Следует отметить, что материал был получен одноразово из одной точки, то есть условия обитания, а следовательно, и вероятный токсический эффект среды совпадали для всех исследованных групп рыб.

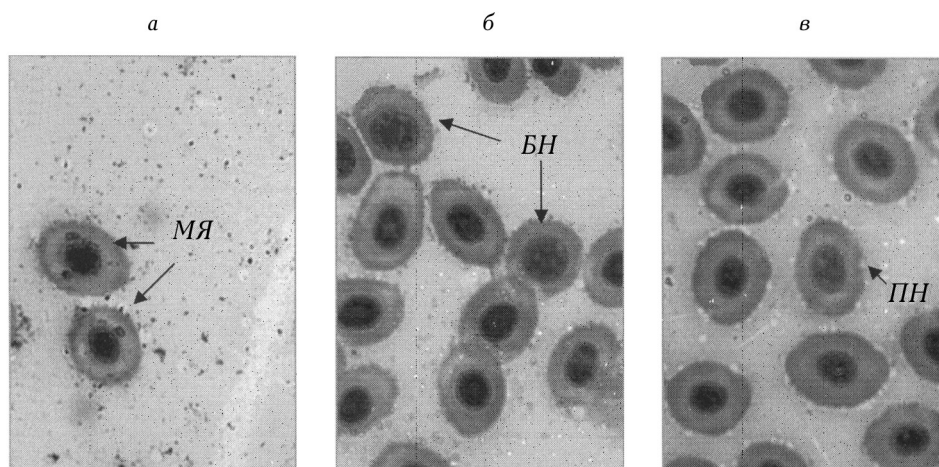
Кровь получали путем отсечения хвостового стебля. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Рихтер, Венгрия). Мазки крови окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма [5]. На мазках подсчитывали долю клеток с микроядрами, а также содержание незрелых эритроидных форм: базофильных и полихроматофильных нормобластов. Объем выборки составил 1000 клеток на мазок. В работе применяли светооптический микроскоп Биолар (Польша). Препараты просматривали под иммерсией (увеличение $\times 1250$).

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде

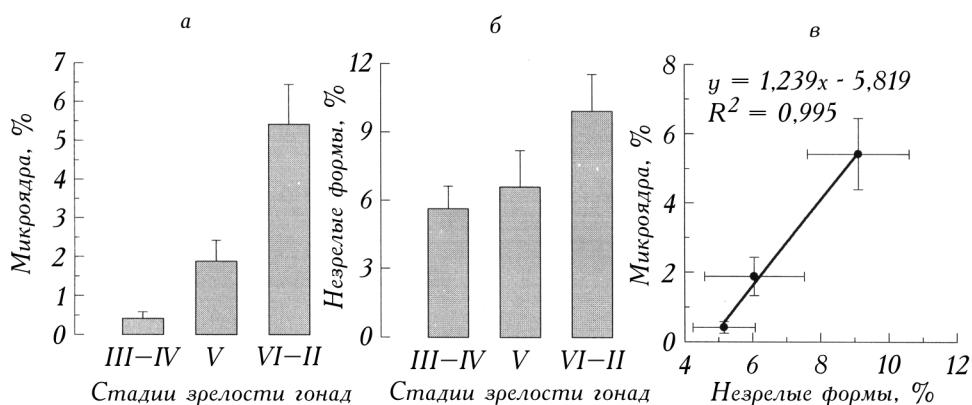
Достоверность различий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению абсолютных величин средней арифметической и моды.

Результаты исследований и их обсуждение

Просмотр гистологических препаратов позволил обнаружить в циркулирующей крови бычков зрелые эритроциты с микроядрами, в среднем 1—2 единицы на клетку (рис. 1, а). Как показали наблюдения, число клеток с данными структурами зависело от степени зрелости гонад. В преднерестовом состоянии (III—IV стадии зрелости гонад) на них приходилось около 0,5% общей эритроцитарной массы (рис. 2, а). У текущих особей (V стадия зрелости гонад) количество данных клеточных форм повышалось в 4,5 раза ($p < 0,01$) и составляло около 2%. У отнерестившихся рыб (VI—II стадии зрелости гонад) величина этого показателя была еще выше. Значения его в 12,9 раза ($p < 0,001$) превышали исходные величины (более 5% клеток). Как уже отме-



1. Микрофотографии эритроцитов с микроядерными включениями (а), базофильных (б) и полихроматофильных (в) нормобластов в крови бычка-кругляка: МЯ — эритроциты с микроядрами; БН — базофильные нормобласты; ПН — полихроматофильные нормобласты (масляная иммерсия, $\times 1250$).



2. Содержание эритроцитов с микроядерными включениями и незрелых эритроидных форм в крови бычка-кругляка в зависимости от стадии зрелости гонад: а — эритроциты с микроядерными включениями; б — сумма базофильных и полихроматофильных нормобластов; в — корреляционные отношения: эритроциты с микроядрами — незрелые эритроидные формы.

чалось, материал был получен одновременно из одной точки, то есть условия обитания, а, следовательно, и токсические эффекты среды совпадали для всех исследованных групп рыб. Это означает, что выявленные различия определялись исключительно состоянием организма бычка.

Для оценки темпов пролиферативной активности очагов эритропоэза на мазах крови подсчитывали число незрелых эритроидных элементов: базофильных и полихроматофильных нормобластов (см. рис. 1, б, в). Базофильные нормобласты — это слабо дифференцированные эритроидные клетки, являющиеся производными пронормобласта и сохраняющие способность к

пролиферации [7, 14]. Они имеют округлую форму, нежно-сетчатое красно-фиолетовое относительно крупное ядро с развитой перинуклеарной зоной. Гетерохроматин слабо выражен, не более 50% объема ядра, что отражает достаточно высокую интенсивность транскрипционных процессов в этой структуре. Базофильная цитоплазма практически не содержит гемоглобина. Высокое сродство ее к основным красителям отражает присутствие нуклеиновых кислот и повышенную интенсивность биосинтетических процессов в клетке.

Полихроматофильные нормобласты — форменные элементы, представляющие собой терминальную стадию дифференцировки. Они утрачивают способность к делению [7, 14]. Приобретают эллипсоидную форму. Грязно-серый оттенок цитоплазмы свидетельствует о присутствии в ней одно-временно нуклеиновых кислот и ацидофильного гемоглобина. В сравнении с базофильным нормобластом ядро имеет форму эллипса и меньшие размеры. Перинуклеарная зона практически не выражена. Гетерохроматин занимает незначительный объем ядра, что также отражает достаточно высокую функциональную активность этой структуры.

Количественная оценка суммарного содержания базофильных и полихроматофильных нормобластов в крови бычка в зависимости от стадии зрелости гонад представлена на рисунке 2, б. Она позволяет констатировать увеличение значений данного показателя. Особенно заметны различия между особями, гонады которых находятся на III—IV и VI—II стадиях зрелости. Они составляют более 40% ($p < 0,05$).

Рост эритропоэтической активности кроветворной ткани бычка в нерестовый период может определяться анемичностью преднерестового состояния, которое было отмечено для ряда костистых видов рыб как в естественных, так и экспериментальных условиях (инъекции гормональных препаратов) [8, 10, 12]. Анемия является самым мощным фактором выработки эритропоэтинов. О возможности продукции данных соединений в организме рыб свидетельствуют работы, выполненные на радужной форели [15]. Иммунохимически они были идентифицированы у данного вида в почках, селезенке, печени и плазме крови. Местом их образования, по всей видимости, являются почки. Здесь была обнаружена самая высокая концентрация эритропоэтинов. Отмечено также, что продукция эритропоэтинов в организме рыб положительно коррелирует с содержанием половых гормонов в крови, в частности тестостерона [11]. Из этого следует, что нерест и продукция эритроцитов кроветворной тканью являются в достаточной степени сопряженными процессами.

Из результатов, представленных на рисунке 2, следует, что состояние нереста характеризуется одновременным повышением содержания в крови рыб незрелых эритроидных форм и количества эритроцитов, несущих микроядра. Это позволяет предположить, что высокая пролиферативная активность кроветворной ткани сопряжена с ростом числа ошибок в распределении ядерного материала между дочерними клетками. Оценка коррелятивной связи между этими процессами подтверждает данное предположение. Зависимость хорошо описывается уравнением линейной регрессии при высоких значениях углового коэффициента и коэффициента детерминации — 0,995 (рис. 2, в). Это позволяет говорить о том, что чем интенсивнее проли-

феративная активность тканей, тем выше вероятность нарушений в геноме клетки, то есть применение микроядерного теста в оценке генотоксичности окружающей среды не всегда адекватно и требует учета функционального состояния организма.

Заклучение

Пролиферативная активность эритроидного ростка кроветворения у бычка-кругляка возрастает по мере приближения его организма к состоянию нереста: переход от III—IV к V и VI—II стадиям зрелости гонад. Об этом свидетельствует рост содержания в крови рыб малодифференцированных эритроидных форм: базофильных и полихроматофильных нормобластов. Одновременно в кровяном русле повышается содержание зрелых эритроцитов с микроядерными включениями. Между этими процессами установлена выраженная корреляционная связь ($R^2 = 0,995$). Это означает, что высокая пролиферативная активность тканей допускает увеличение доли поврежденных ДНК, частным вариантом которых и является образование микроядер в клетке. Отсюда следует, что применение микроядерного теста на практике при оценке степени генотоксичности морской среды требует учета естественного состояния организма.

**

*Досліджено залежність між вмістом микроядерних включень у зрілих еритроцитах бичка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pallas) і інтенсивністю еритропоетичних процесів у його кровотвірній тканині. Показано, що проліферативна активність еритроїдного ростка кроветворення у даного виду зростає в міру наближення його організму до стану нересту: перехід від III—IV до V і VI—II стадій зрілості гонад. Про це свідчить зростання вмісту у крові рыб мало диференційованих еритроїдних форм: базофільних і поліхроматофільних нормобластів. Одночасно в кров'яному руслі підвищується вміст зрілих еритроцитів з микроядерними включеннями. Між цими процесами встановлено виражений кореляційний зв'язок ($R^2 = 0,995$). Це свідчить про те, що висока проліферативна активність тканин допускає збільшення частки ушкоджень ДНК, одним із варіантів яких і є утворення микроядер у клітинах. Звідси випливає, що застосування микроядерного тесту на практиці при оцінці ступеня генотоксичності водного середовища вимагає урахування природного стану організму.*

**

*The dependence between the content of micronuclei inclusions in mature erythrocytes of round goby (*Neogobius melanostomus* Pallas) and intensity of erythropoietic processes in blood-forming tissue was investigated. It was shown that the proliferative activity of erythroid sprout of the blood-forming tissue in this species increased with the approach of the organism to a state of spawning, i.e. the transition from the III—IV to V and VI—II stages of gonad maturity. This is confirmed by an increase in the content of immature erythroid forms (basophilic and polychromatophilic normoblasts) in fish blood. Simultaneously the content of mature red blood cells with micronuclei inclusions increased in the bloodstream. Pronounced correlation between these processes was determined ($R^2 = 0,995$) indicating that high proliferative activity of tissues may result in the increase in the percentage of DNA damages, e.g. the formation of micronuclei in cells. Consequently, the application of the micronuclear test to estimate the degree of genotoxicity of marine environment in practice requires taking into account natural state of the organism.*

**

1. Давыгов О.Н. Патология крови рыб. — Фирма «ИНКОС», 2006. — 206 с.
2. Изюмов Ю.Г., Таликина М.Г., Чеботарева Ю.В. Количество микроядер в эритроцитах периферической крови плотвы *Rutilus rutilus* и леща *Abramis brama* Рыбинского и Горьковского водохранилищ // Биология внутр. вод. — 2003. — № 1. — С. 98—101.
3. Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. — Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992 г. — 272 с.
4. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока // Экол. генетика. — 2006. — Т. 4, № 3. — С. 7—19.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — 501 с.
6. Маслова М.Н., Тавровская Т.В. Динамика сезонных изменений в системе красной крови низших позвоночных: сезонная динамика эритропоэза у форели *Salmo gairdneri* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1991. — Т. 27. — С. 796—798.
7. Солгатов А.А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб (обзор) // Там же. — 2005. — Т. 41, № 3. — С. 217—223.
8. Солгатов А.А. Эритропоэз и концентрация метгемоглобина в крови кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) на протяжении годового цикла // Совр. пробл. физиол. биохим. водных организмов. — Петрозаводск: Изд-во Ин-та биол. КарНЦ РАН, 2005. — С. 182—187.
9. Auletta A. E., Dearfield K. L., Cimino M. C. Mutagenicity test schemes and guidelines: US EPA Office of Pollution Prevention and Toxics and Office of Pesticide Programs // Environm. Mol. Mutagen. — 1993. — Vol. 21. — P. 38—45.
10. Ochiai A., Ogawa M., Umeda S., Taniguchi N. Change of blood properties of maturing japan eel at hormonal influences // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. — 1975. — Vol. 41, N 6. — P. 609—614.
11. Pottinger T.G., Pickering A.D. Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. // Fish Physiol. Biochem. — 1987. — Vol. 3. — P. 121—126.
12. Ranzani-Paiva M.J.T. Hematological characteristics of the mullet, *Mugil platanus* G. from Cananeia lagoon-estuarine region // Bol. Inst. Pesca-Sao-Paulo. — 1995. — Vol. 22. — P. 1—22.
13. Rosefort C, Fauth E, Zankl H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay // Mutagenesis. — 2004. — Vol. 19, N 4. — P. 277—284.
14. Soldatov A.A. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study // J. Fish Biol. — 1996. — Vol. 48, N 3. — P. 321—328.
15. Wickramasinghe S.N. Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri* // Comp. Biochem. Physiol. — 1993. — Vol. 104A. — P. 63-65.