

УДК 575.22;575.224

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ПРИ ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

© 2018 г. Е. Ю. Крысанов^{1,*}, К. Г. Орджоникидзе^{1,2}, С. А. Симановский¹

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

119071, Москва, Ленинский пр. 33

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова

119991, Москва, ул. Губкина, д. 3

*E-mail: krysanov@sevin.ru

Поступила в редакцию 22.06.2017 г.

В статье рассмотрены практические аспекты применения цитогенетических индикаторов при анализе состояния окружающей среды. Представлены цитогенетические характеристики предлагаемого в качестве тест-объекта вида рыб *Nothobranchius rachovii*.

Ключевые слова: цитогенетика, микроядра, аберрации хромосом, сестринские хроматидные обмены, мейоз, окружающая среда, *Nothobranchius rachovii*, синаптонемный комплекс

DOI: 10.7868/S0475145018010056

ВВЕДЕНИЕ

К цитогенетическим методам, которые в настоящее время применяются при анализе воздействия различного рода антропогенных факторов (радиация, экотоксиканты и др.) можно отнести следующие цитогенетические характеристики: аберрации хромосом, сестринские хроматидные обмены, микроядра, ДНК-комет, нарушения мейоза.

В силу разнообразных причин, о которых подробнее будет сказано ниже, к наиболее распространенным следует отнести только два из вышеприведенных, а именно анализ частот микроядер и ДНК-комет тест.

В последнее время именно эти методы получили наибольшее распространение в силу их достаточной методической простоты и возможностью автоматизации.

Следует также отметить, что работ, в которых применяются цитогенетические методы при анализе воздействия антропогенных факторов на природные популяции не так много. В первую очередь это связано с комплексным воздействием разнообразных по природе факторов на геном. В подавляющем числе работ использовали анализ микроядер и/или ДНК-комет тест.

При анализе цитогенетических нарушений в природных популяциях следует учитывать, что вызывать их могут не только присутствующие в окружающей среде экотоксиканты, например, повышенный радиационный фон, но и разнообразные естественные факторы, как абиотической, так и биотической

природы. Это могут быть резкие колебания температуры, кислотности, популяционный стресс, вирусные инфекции, паразитарные инвазии, гормональные нарушения и пр. Кроме того, известно, что в процессе онтогенеза может изменяться частота цитогенетических нарушений, например, аберраций хромосом (Krysanov, 1992).

В связи с этим, при выполнении цитогенетических исследований в природных популяциях необходимо работать с большими выборками, выровненными хотя бы по половому и возрастному составу. В дальнейшем это будет способствовать корректному статистическому анализу.

Кроме того, следует по возможности применять методы, исключающие травматические последствия для животных.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

На первоначальном этапе исследования, как нам представляется, необходимо выполнять предварительный скрининг на отобранных для исследования полигонах.

Кроме того, для более точной оценки воздействия антропогенных факторов на природные биологические объекты необходимо провести анализ воздействия этих же факторов используя лабораторных животных. Это могут быть, например, пробы воды или водные вытяжки с исследуемых территорий, а также инкубация подопытных животных на исследуемых полигонах.

Основные цитогенетические методы применяемые при оценках состояния окружающей среды были нами описаны ранее (Ordzhonikidze et al., 2015), там же рассмотрены их основные особенности. Поэтому здесь мы вкратце остановимся лишь на двух из них. Один из них посвящен анализу повреждений ДНК (ДНК-комет), другой нарушениям в мейозе.

Метод ДНК-комет

Гель-электрофорез единичных клеток, или метод ДНК-комет, в настоящее время является одним из самых широко применяемых методов биомониторинга и оценки рисков окружающей среды, включая водную среду, которая зачастую выступает конечным звеном в накоплении загрязняющих агентов антропогенной природы. Клетки, извлеченные из различных тканей в виде суспензии, помещаются в агарозный гель, лизируются и подвергаются электрофорезу. Фрагменты ДНК поврежденных клеток мигрируют под влиянием электрического поля, демонстрируя при микроскопической оценке большую или меньшую степень повреждения ДНК вследствие одно-/двунитевых разрывов ДНК. Таким образом, метод позволяет оценить степень повреждения ДНК напрямую. Существует большое число модификаций данного метода для оценки разных типов повреждений ДНК — щелочная и нейтральная; оценка апоптоза и окислительного стресса, репарации и т.д.

К числу преимуществ данного метода в его применении для биоиндикации и оценки экологических рисков относят его воспроизводимость на большом спектре организмов (растения, млекопитающие, рыбы, ракообразные, моллюски, черви), доступность и, в ряде случаев с определенными ограничениями, использования в полевых условиях. При этом отсутствует необходимость предварительного знания кариотипа или клеточного цикла.

Эко-генотоксикологические исследования окружающей среды определяют и ограничения применения метода ДНК-комет. В подобных исследованиях возникает большое количество дополнительных факторов, которые необходимо принимать во внимание: наличие комплексного вклада физических, химических и биологических факторов, вносящих вклад в генотоксический эффект в природных условиях; выявление целевых видов и определение наиболее чувствительных к воздействию генотоксикантов стадий жизненного цикла; индивидуальная изменчивость и генетическая восприимчивость и т.д. Помимо таких факторов, как пол и возраст, вышеперечисленные аспекты делают полевые исследования более сложными, по сравнению с лабораторными, когда большинство из них возможно контролировать в той

или иной степени, а также подчеркивают необходимость наработки исторических контролей и уровней фонового воздействия различных природных генотоксикантов, по сравнению с оценкой антропогенного воздействия (Jha et al., 2004).

Одним из важнейших этапов оценки рисков методом ДНК-комет является выбор видов и органа-мишени. Несмотря на наличие исследований на амфибиях, морских млекопитающих, ракообразных (Lacaze et al., 2011), наиболее часто и успешно применяемыми для рассматриваемого метода объектами водной среды являются рыбы и моллюски. У рыб чаще всего исследуют печень, жабры, предпочку и периферические эритроциты; у моллюсков — гемолимфу, пищеварительные железы (гепатопанкреас) и клетки жабр. Исследование генотоксического эффекта проб воды (р. Велика Моравя), где было зафиксировано повышенное содержание цинка, меди, никеля и кадмия, на пресноводном моллюске (*Sinanodonta woodiana*) подтвердило не только его высокую чувствительность, как тест-объекта, но и возможность исследовать процесс репарации ДНК (Kolarević et al., 2013); уровень повреждений ДНК положительно коррелировал с концентрациями металлов. Пищеварительные железы участвуют в трансформации ксенобиотиков и вследствие этого являются прямым органом-мишенью для ДНК-повреждающих агентов. Клетки жабр — компоненты органов фильтрации, оказываются первым барьером на пути потенциальных загрязняющих агентов и представляют интерес для оценки рисков методом ДНК-комет. Однако, при использовании тканей необходимо проводить лизис для клеточной диссоциации, а этот этап сам по себе сопряжен с риском индуцирования повреждений ДНК. Таким образом, для каждого индикаторного вида и органа-мишени необходимо проводить стандартизацию протокола и оценивать базовые уровни повреждений ДНК (Bolognesi et al., 2014; Frenzilli et al., 2009).

Для получения более точных результатов и дополнения картины исследования метод ДНК-комет применяют в сочетании с другими общепринятыми цитогенетическими и молекулярными методами — подсчетом частот микроядер, хромосомных аберраций, вариациями метода ДНК-комет (Comet-FISH).

Так, например, в исследовании, посвященном оценке генотоксических эффектов тяжелых металлов, присутствующих в водоеме на северо-востоке Бразилии, авторы применили группу тестов. Химический анализ воды в различные сезоны на протяжении двух лет выявил повышенное содержание кадмия, свинца, цинка, меди и других металлов. *Allium cepa*-тест показал статистически значимо повышенный уровень хромосомных аберраций и митотического индекса, а метод ДНК-комет

повышенный уровень разрывов ДНК в эритроцитах нильской тилипии, тогда как частота микроядер оставалась на уровне контроля (Barbosa et al., 2010).

Нарушения мейоза

Формирующиеся половые клетки высокочувствительны к действию факторов окружающей среды. Наиболее чувствительным этапом формирования половых клеток является деление мейоза, на этапе которого могут проявляться как нарушения, возникшие ранее в соматических клетках, так и нарушения, специфические для мейоза.

Косвенным методом оценки хода мейоза является метод учёта доминантных летелей у млекопитающих. Метод основан на оценке генетических изменений в гаметах подвергавшихся воздействию самцов по выживаемости эмбрионов в скрещиваниях с интактными самками. Считается, что доминантные летели являются результатом численных и структурных изменений хромосом в гаметах, образованных в результате нарушенного мейоза (Абилев, Глазер, 2015). Для растений существует пыльцевой тест, который основан на учёте фертильных и стерильных пыльцевых зёрен, и также даёт косвенную оценку хода мейоза в пыльниках подвергавшихся воздействию растений. Метод успешно применялся для анализа загрязнённых территорий (Гераськина, Сарапульцева, 2010).

Прямым методом изучения мейоза является классический метод учёта реципрокных транслокаций, который осуществляется в сперматоцитах I порядка на стадиях диакинеза-метафазы I. В случае наличия реципрокной транслокации на этих стадиях обнаруживается квадριвалент, либо более сложные мультивалентные ассоциации, если транслокаций две и более. Считается, что в сперматогониях (предшественниках сперматоцитов) при воздействиях могут возникать различные типы хромосомных перестроек, но многие из них элиминируются во время митотических делений и до профазы I мейоза доходят только те клетки, которые несут сбалансированные хромосомные перестройки (реципрокные транслокации) (Абилев, Глазер, 2015).

Наиболее точным методом выявления реципрокных транслокаций в мейозе является электронно-микроскопический анализ контрастированных азотнокислым серебром синаптонемных комплексов (СК) в профазе I мейоза. Благодаря большой чувствительности ультраструктурного анализа, конфигурации СК позволяют выявить не только мелкие транслокации, но и делеции, внутрихромосомные aberrации, ассоциации аутосом с половым бивалентом и другие нарушения, которые недоступны для анализа в диакинезе-метафазе I (Allen et al., 1988; Backer, 1990; Богданов, Коломиец, 2007). В среднем,

частота выявления транслокаций при анализе СК превышает частоту выявления транслокаций в диакинезе-метафазе в 1,8 раза. Современным методом изучения СК является иммунофлуоресцентный анализ с использованием антител к специфичным белкам структурных компонентов СК, кинетохоров, хроматина, рекомбинации. Иммунофлуоресцентный анализ кроме структурных нарушений хромосом способен выявить особенности мейотической рекомбинации, поведения полового бивалента, процессов транскрипции, инактивации хроматина. Наиболее точных данных о динамике мейоза можно добиться, комбинируя эти методы (анализ диакинеза — метафазы I, электронно-микроскопический и иммунофлуоресцентный анализы СК).

Метод анализа СК был применён при изучении репродуктивной системы мышей и крыс, подвергавшихся действию ионизирующих (ЧАЭС) и рентгеновских излучений, широкого спектра мутагенов и лекарственных препаратов (Allen et al., 1988; Backer, 1990; Pina-Calva, 1997; Cusido et al., 1995; Pujol et al., 1997; Богданов, Коломиец, 2007; Коломиец и др., 2013; Ловинская и др., 2016).

На ход мейоза могут оказывать воздействие не только антропогенные, но и естественные биотические и абиотические факторы (температура, концентрация определенных элементов, вирусные инфекции и пр.) (Andronic, 2012; Higgins et al., 2012; Si et al., 2015; Lambing et al., 2017), что необходимо учитывать при анализе.

В качестве природных объектов для оценки цитогенетических показателей среди позвоночных можно рекомендовать представителей рыб, амфибий и мелких млекопитающих, широко распространенных в регионе исследования. Для анализа aberrаций хромосом наиболее пригодны виды, имеющие наименьшее число диплоидных хромосом. В случае применения методов подсчета микроядер и ДНК-комет можно использовать любые широко распространенные в данном регионе виды животных. При анализе мейоза следует помнить, что в средних широтах он имеет сезонную выраженность (разные фазы мейоза могут быть достаточно тесно связаны с сезонами года). Для тропических видов это не так существенно.

Среди приведенных выше методов наиболее доступным и простым в техническом отношении является метод подсчета микроядер. Для исследования микроядер могут быть использованы различные органы и ткани. Следует лишь учитывать, что они могут обладать разной чувствительностью к экотоксикантам. Метод не требует умерщвления животного и позволяет взять пробы от значительного количества экземпляров, что упрощает последующие статистические расчеты. Кроме того, возможно использование видов разных

систематических групп, что повышает объективность оценки. Поэтому в качестве первоначального сканирования выбранной территории мы предлагаем использовать именно его. Необходимо лишь учитывать, что чувствительность данного метода ниже, чем, например, ДНК комет-теста.

Лабораторные эксперименты необходимы при уточнении первоначальных данных, полученных при скрининге природных популяций. Они позволяют использовать ряд методов, таких как комет-тест, анализ нарушений в мейозе, анализ aberrаций хромосом и сестринских хроматидных обменов, которые трудно применить в полевых исследованиях.

ЛАБОРАТОРНЫЙ ОБЪЕКТ

В качестве лабораторного объекта для использования как тест-объекта для оценки генотоксичности факторов окружающей среды целесообразно использовать тропическую рыбу *Nothobranchius rachovii*. Данный вид имеет минимальное среди рыб и общепринятых лабораторных животных диплоидное число достаточно крупных хромосом равное 16 (рис. 1). Достаточно прост в содержании и разведении в лабораторных условиях. Имеет короткий жизненный цикл (3–4 месяца после выклева из икры). Половозрелость наступает через месяц после выклева. В эмбриональном развитии имеет диапаузу продолжительностью от 1 до 3 месяцев. Кроме того, для кроветворного органа (пронефрос) отмечена высокая митотическая активность, что позволяет получить достаточное количество метафазных пластинок хорошего качества. Это особенно важно для анализа сестринских хроматидных обменов (рис. 2). Поскольку в мейозе наблюдаются всего 8 бивалентов, образованных крупными хромосомами (рис. 3 и 4), значительно упрощается оценка мейотических нарушений и повышается ее точность. Достаточно прост учет хромосомных aberrаций (рис. 5). Представителей рода *Nothobranchius* в настоящее время используют в многочисленных биологических исследованиях. Они достаточно хорошо

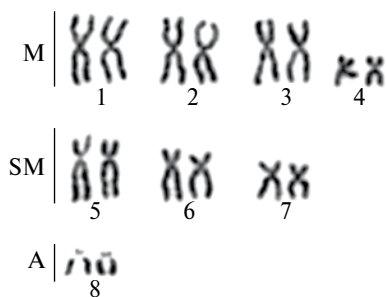


Рис. 1. Кариотип *Nothobranchius rachovi* (М - метацентрические хромосомы, SM - субметацентрические хромосомы, А - акроцентрические хромосомы).



Рис. 2. Сестринские хроматидные обмены у *N. rachovii* (указаны стрелками).



Рис. 3. Иммунофлуоресцентное выявление синаптонемных комплексов (СК) в сперматocyтах *N. rachovii* (норма) с помощью антител против белка SYCP3 (белый цвет): 8 СК-бивалентов на стадии пахитены. Хроматин окрашен DAPI (серый цвет).

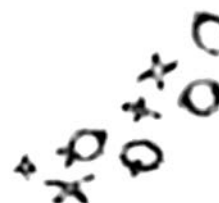


Рис. 4. Сперматocyт *N. rachovii* (норма) на стадии метафазы I: 8 бивалентов (4 бивалента с одной хиазмой, 4 - с двумя хиазмами).



Рис. 5. Аберрантная метафаза у *N. rachovii*.

изучены в молекулярно-генетическом отношении. Особенно это касается *Nothobranchius furzeri*, геном которого полностью отсеквенирован, что позволяет исследовать кариотипические преобразования, ранее не доступные в силу ограничений рутинных методов окрашивания хромосом (Petzold et al., 2013; Reichwald et al., 2015; Baumgart et al., 2016). *N. rachovii* ранее уже предлагали использовать в токсикологических экспериментах (Gaag et al., 1983; Gaag et al., 1983; Kerkhoff and Gaag 1985). Однако широкому применению данного вида в генотоксикологии помешал ряд методических трудностей, связанных с получением достаточного количества метафаз, а также разведением в лабораторных условиях. В дальнейшем они были успешно преодолены (Krysanov, 1992; Polačik et al., 2016). Поскольку при оценке состояния окружающей среды обычно используются водоемы, как аккумуляторы различного рода экотоксикантов, такое биотестирование представляется необходимым для получения адекватных результатов. При отсутствии водоемов в зонах тестирования можно использовать водные вытяжки почв.

Таким образом, вид рыб *Nothobranchius rachovi* является весьма перспективным для проведения экотоксикологических исследований и имеет явные преимущества в этом отношении по сравнению с традиционным тест-объектом водной токсикологии данио рерио.

Работа была выполнена при частичной поддержке РФФИ грант № 16-04-01102

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абилев С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие. М.; СПб.: Нестор-История, 2015. 304 с.
- Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг / Под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. М.: "Академия", 2010. 218 с.
- Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптомемный комплекс — индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом // М.: КМК, 2007. 358 с.
- Коломиец О.Л., Ацаева М.М., Дадашев С.Я., Абилев С.К., Спангенберг В.Е., Матвеевский С.Н. Нарушения структуры синаптомемных комплексов и особенности селекции сперматоцитов I порядка у мыши в ответ на введение лекарственных препаратов // Генетика. 2013. Т. 49. № 11. С. 1261–1269.
- Ловинская А.В., Колумбаева С.Ж., Коломиец О.Л., Абилев С.К. Генотоксическое действие пестицида фипронила на соматические и генеративные клетки мышей // Генетика. 2016. Т. 52. № 5. С. 561–568.
- Allen J.W., Poorman P.A., Backer L.C., Gibson J.B., Westbrook-Collins B., Moses M.J. Synaptonemal complex damage as a measure of genotoxicity at meiosis // Cell Biol. Toxicol. 1988. V. 4. № 4. P. 487–494.
- Andronic L. Viruses as triggers of DNA rearrangements in host plants // Can J Plant Sci 2012. V. 92. P. 1083–1091.
- Backer L.C., Moses M.J., Allen J.W. Synaptonemal complex analysis in genetic toxicology // Prog. Clin. Biol. Res. 1990. V. 340B. P. 457–466.
- Barbosa, J.S., et al. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010 V. 73. № 3. P. 320–325.
- Baumgart M., Priebe S., Groth M., Hartmann N., Menzel U., Pandolfini L. et al. Longitudinal RNA-Seq Analysis of Vertebrate Aging Identifies Mitochondrial Complex I as a Small-Molecule-Sensitive Modifier of Lifespan. // Cell Syst. 2016. V. 2. P. 122–132.
- Bolognesi C., Silvia C. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators // Current Zoology. 2014. V. 60. № 2. P. 273–284.
- Cusidó L., Pujol R., Egozcue J., García M. Cyclophosphamide-induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase of female *Rattus norvegicus* // Mutat. Res. — Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 1995. V. 329. № 2. P. 131–141.
- Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2009. V. 681. № 1. P. 80–92.
- Gaag M.A., Alink G.M., Hack P., Hoeven J.C.M., & Kerkhoff J.F.J. Genotoxicological study of Rhine water with the killfish *Nothobranchius rachowi* // Mutation Research / Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 1983. V. 113. № 3. P. 311.
- Gaag M.A., and Kerkhoff J.F.J. Mutagenicity testing of water with fish: A step forward to a reliable assay // Science of The Total Environment. 1985. V. 47. P. 293–298.
- Higgins J.D., Perry R.M., Barakate A., Ramsay L., Waugh R., Halpin C., Armstrong S.J., Franklin F.C. Spatiotemporal asymmetry of the meiotic program underlies the predominantly distal distribution of meiotic crossovers in barley // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 4096–4109.
- Jha A.N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview // Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2004. V. 552. № 1. P. 1–17.
- Kolarević S., Knežević-Vukčević J., Paunović M., Kračun M., Vasiljević B., Tomović J., Vuković-Gačić B., Gačić Z. Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay // Chemosphere. 2013. V. 93. № 2. P. 243–251.
- Kerkhoff J.F.J. & Gaag M.A. Some factors affecting optimal differential staining of sister-chromatids in vivo in the fish *Nothobranchius rachowi* // Mutation Research Letters. 1985. V. 143. № 1–2. P. 39–43.
- Krysanov E.Y. (1992). Aneuploidy in postnatal ontogenesis of fishes // Acta Zool. Fennica. 1992. V. 191. P. 177–182.

- Lacaze E., Devaux A., Mons R., Bony S., Garric J., Gelfard A., Gelfard O. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater genotoxicity assessment // *Environmental Pollution*. 2011. V. 159. № 6. P. 1682–1691.
- Lambing C., Franklin F.C.H., Wang C.-J.R. Understanding and manipulating meiotic recombination in plants // *Plant Physiol*. 2017. V. 173. № 3. P. 1530–1542.
- Ordzhonikidze C.G., Demidova T.B., Krysanov E. Yu. Evaluation of genetic homeostasis in animals at different stages of ontogenesis in the environment // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2014. V. 45. № 3. P. 134–142.
- Petzold A., Reichwald K., Groth M., Taudien S., Hartmann N., Priebe S. et al. The transcript catalogue of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri* provides insights into age-dependent changes of mRNA levels // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. 185.
- Piña-Calva A., Quezada-Medina R., Madrigal-Bujaidar E. Synaptonemal complex damage in mouse spermatocytes exposed to tequila and brandy // *Cancer Detect. Prev*. 1997. V. 21. № 2. 196–200.
- Poláčik M., Blažek R., & Reichard M. Laboratory breeding of the short-lived annual killifish *Nothobranchius furzeri* // *Nat Protoc*. 2016. V. 11. № 8. P. 1396–1413.
- Pujol R., Cusidó L., Rubio A., Egozcúe J., Garcia M. X-ray-induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase in female fetuses of *Rattus norvegicus* // *Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen*. 1997. V. 379. № 2. P. 127–134.
- Reichwald K., Petzold A., Koch P., Downie B.R., Hartmann N., Pietsch S. et al. Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish // *Cell*. 2015. V. 163. № 6. P. 1527–1538.
- Si W., Yuan Y., Huang J., Zhang X., Zhang Y., Zhang Y., Tian D., Wang C., Yang Y., Yang S. Widely distributed hot and cold spots in meiotic recombination as shown by the sequencing of rice F2 plants // *New Phytol*. 2015. V. 206. P. 1491–1502.

Cytogenetic Indicators in Estimation of Environmental State

E. Yu. Krysanov^{1,*}, K. G. Ordzhonikidze², and S. A. Simanovskii¹

¹*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*The Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russia*

*e-mail: krysanov@sevin.ru

Received June 22, 2017

Practical aspects of the application of cytogenetic indicators during the analysis of the environmental state are considered in the article. Cytogenetic characteristics of the *Nothobranchius rachovii* fish species (proposed as a test object) are presented.

Keywords: cytogenetics, micronuclei, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, meiosis, environment, *Nothobranchius rachovii*