

УСТОЙЧИВОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ: ОРГАНИЗМ

УДК 575.22;575.224

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГОМЕОСТАЗ И ЗДОРОВЬЕ СРЕДЫ (ПРАКТИКА ОЦЕНКИ)

© 2023 г. Е. Ю. Крысанов*, @, К. Г. Орджоникидзе*, **, С. А. Симановский*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 119071 Россия

**Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119991 Россия

@E-mail: krysanov@sevin.ru

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2023 г.

В статье рассматриваются возможные подходы для оценки цитогенетического гомеостаза в природных популяциях. Обсуждаются различные цитогенетические методы, их преимущества, недостатки и ограничения, связанные с исследованием животных в естественной среде обитания. Для надежной характеристики качества окружающей среды рекомендуется дополнять оценки, полученные в природных популяциях, лабораторными экспериментами с использованием тест-объекта. В силу целого ряда особенностей, в качестве такого объекта предлагается использовать короткоцикловых рыб *Nothobranchius rachovii*.

Ключевые слова: митоз, мейоз, микроядра, метод ДНК-комет, хромосомные aberrации, сестринские хроматидные обмены

DOI: 10.31857/S1026347023600206, **EDN:** VGSCQJ

Организм на протяжении всего своего развития подвергается воздействию разнообразных факторов как внешних, так и внутренних. Одной из главных особенностей живого организма является способность к поддержанию гомеостаза. В обычных условиях организм реагирует на воздействие среды посредством сложной физиологической системы буферных гомеостатических механизмов. Эти механизмы поддерживают оптимальное протекание процессов развития. Под воздействием неблагоприятных условий эти механизмы могут быть нарушены (Zakharov *et al.*, 2017).

Изменения гомеостаза отражают базовые изменения функционирования живых организмов и находят выражение в процессах, протекающих на разных уровнях, от молекулярного до организменного, и, соответственно, могут быть оценены по различным параметрам с использованием различных методов. Способность организма поддерживать целостность структур, несущих генетическую информацию, можно называть цитогенетическим гомеостазом. Существуют разнообразные методы для его оценки. При анализе цитогенетических нарушений в природных популяциях следует учитывать, что вызывать их могут не только присутствующие в окружающей среде загрязняющие вещества, но и разнообразные естественные факторы, как абиотической, так и биотической природы. Это могут быть резкие колебания тем-

пературы, кислотности, популяционный стресс, вирусные инфекции, паразитарные инвазии, гормональные нарушения и другие факторы (Ильинских и др., 1990; Ilyinskikh *et al.*, 2012; Zakharov, Trofimov, 2022). Кроме того, известно, что и в ходе онтогенеза может изменяться частота цитогенетических нарушений, например, aberrаций хромосом (Krysanov, 1992).

К основным методам оценки цитогенетического гомеостаза можно отнести анализ частоты повреждений ДНК, визуализируемых в виде ДНК-комет, микроядер, хромосомных aberrаций, сестринских хроматидных обменов (СХО) и нарушений мейоза (Mateuca *et al.*, 2012; Орджоникидзе и др., 2014, 2019; Крысанов и др., 2018). Наиболее широко используемыми в настоящее время являются метод ДНК-комет и микроядерный тест. Анализ aberrаций хромосом трудоемок, зависит от характеристик кариотипа и редко используется в полевых исследованиях. Анализ СХО и нарушений мейоза из-за методических ограничений практически не используются при исследовании природных популяций.

Особенности микроядерного теста исследования достаточно полно (Ильинских и др., 2011; Сычева, 2012; Бродский и др., 2012; The Micronucleus..., 2019; Крюков, 2020). К его преимуществам следует отнести возможность применения вне зависимости от особенностей кариотипа, вида ткани и ми-

тотической активности. Кроме того, микроядерный тест не требует умерщвления животных и позволяет собирать репрезентативный материал в полевых условиях.

К числу преимуществ метода ДНК-комет можно отнести возможность его применения для большого спектра организмов (растения, млекопитающие, рыбы, ракообразные, моллюски, черви) и тканей (кровь, печень, почки, мозг, жабры, костный мозг, гонады). При этом отсутствует необходимость предварительного знания кариотипа или особенностей клеточного цикла.

При исследовании природных популяций необходимо принимать во внимание целый ряд дополнительных факторов: наличие комплексного воздействия физических, химических и биологических факторов, вносящих вклад в генотоксический эффект; выявление модельных видов и определение наиболее чувствительных к воздействию органов и стадий жизненного цикла; индивидуальная изменчивость и генетическая восприимчивость. Помимо возможной половой и возрастной изменчивости, перечисленные факторы делают полевые исследования более сложными, по сравнению с лабораторными тестами, в которых большинство из этих параметров в той или иной степени можно контролировать. Все это свидетельствует о необходимости оценки условного контроля и фонового уровня воздействия природных генотоксикантов. Кроме этого, в исследованиях загрязнения окружающей среды особенно важно корректно определять контрольную группу. Метод ДНК-комет не является исключением, так как необходимо убедиться в том, что контрольная группа не подвергалась воздействию исследуемого мутагена. Кроме того, условно контрольная группа может быть затронута заболеваниями или подвергаться воздействию других факторов, что также необходимо учитывать при планировании исследования и интерпретации результатов (Korpen *et al.*, 2017). К недостаткам метода ДНК-комет можно отнести невозможность его применения при использовании фиксированных (замороженных) образцов тканей.

По степени чувствительности указанные цитогенетические тесты можно расположить следующим образом: СХО > абберации хромосом, нарушение мейоза > тест ДНК-комет > микроядра.

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 аббераций хромосом наиболее пригодны виды, имеющие наименьшее диплоидное число хромосом. В случае применения микроядерного теста и метода ДНК-комет можно использовать любые широко распространенные в данном регионе ви-

ды животных. При анализе мейоза следует иметь в виду, что в средних широтах он имеет сезонную выраженность (различные этапы сперматогенеза и оогенеза могут быть достаточно тесно связаны с сезонами года). При выполнении цитогенетических исследований на природных популяциях любых видов необходимо работать с большими выборками, выровненными, как минимум, по половому и возрастному составу. В дальнейшем это будет способствовать корректному статистическому анализу. Кроме того, следует по возможности применять методы, исключаящие травматические последствия для животных.

Таким образом, цитогенетические нарушения зачастую могут быть связаны с различного рода биологическими факторами (эпизоотии, популяционный стресс, паразитарными инфекциями), что может затруднять интерпретацию полученных результатов, особенно на небольших выборках. Увеличение выборок зачастую невозможно в силу различных причин, в том числе и этического характера. Поэтому, представляется целесообразным при исследовании цитогенетических биомаркеров использовать лабораторные модели. Чаще всего различные загрязняющие вещества или находятся в воде, или могут попадать в воду различными путями (атмосферные осадки, почвенные смывы и т.п.). Это определяет целесообразность использования в качестве модельных тест-объектов представителей рыб. Кроме того, рыбы обладают большей чувствительностью по отношению ко многим токсикантам, чем представители других групп животных (Grisolia, 2002).

В связи с этим, нами был выделен ряд параметров, которые являются существенными при выборе модельного объекта для оценки воздействия экотоксикантов: объект должен быть представителем позвоночных животных и по возможности являться конечным звеном пищевой сети (это связано с двумя причинами: возможностью экстраполяции полученных данных в плане оценки потенциального риска на человека и возможностью аккумуляции токсикантов или их метаболитов с пищей); объект должен быть удобен для лабораторных манипуляций (содержание, кормление и воспроизводство); все процедуры, связанные с содержанием и разведением, должны быть максимально простыми и легко контролируемые; линейные и весовые характеристики объекта не должны быть велики; плодовитость объекта должна позволять получить необходимое количество особей для анализа потенциальных токсикантов; продолжительность жизни объекта должна быть максимально коротка, что позволит получить информацию о генетических последствиях воздействия токсикантов в последующих поколениях; объект должен позволять выполнение на нем, как острых, так и хронических экспериментов; объект должен позволять проведение тестов с

токсикантами, как находящимися в окружающей среде и поступающими в организм через соответствующие органы или с пищей, так и вводимыми в организм инъекционным способом; организм должен быть эврибионтным; объект должен позволять проведение токсикологических экспериментов на всех этапах онтогенеза (от эмбриона до взрослого организма); объект должен позволять взятие максимального количества проб для различных анализов от минимального количества особей с возможностью последующей адекватной интерпретации полученных результатов; объект должен позволять проведение на нем максимально возможного количества разнообразных тестов, в том числе поведенческих; объект должен позволять возможность проведение инвазивных процедур при взятии проб для анализа; объект должен обеспечивать взятие проб из разных органов для их количественного анализа.

На наш взгляд, хорошим кандидатом для проведения исследований по оценке воздействия контаминантов на генетический аппарат является один из представителей рода *Nothobranchius* — *Nothobranchius rachovii*. Представители этого рода обитают на территории Восточной Африки и населяют небольшие, пересыхающие во время сухого сезона, водоемы. В связи с этим они имеют очень короткий жизненный цикл. Время, от выклева из икры до естественной смерти составляет около года, а у *N. rachovii* и некоторых других видов — 3–6 мес. Кроме того, икра переживает высыхание водоемов, впадая в диапаузу, которая может продолжаться от 3 мес. до года. Ранее предпринимались попытки использовать *Nothobranchius rachovii* в качестве тест-объекта для оценки качества воды (Gaag, Kerkhoff, 1985). Эмбриональное развитие *N. rachovii* занимает от 30 до 60 сут в зависимости от внешних условий (температура, влажность субстрата, концентрации кислорода и освещенности). После выклева мальки рыб сразу переходят на внешнее питание науплиями артемии. Икра может переживать засушливый сезон без воды, что позволяет проводить эксперименты с инкубацией икры в донных субстратах в течение продолжительного времени. Кроме того, можно всегда иметь необходимое количество икры для проведения экспериментов на ранних стадиях постэмбрионального развития и в течение короткого срока (4–5 нед.) получить необходимое количество половозрелых рыб. Икру рыб можно пересылать по почте, что удобно при межлабораторных исследованиях. Из приведенных выше данных очевидно, что *Nothobranchius rachovii*, обладающий одним из наименьших среди кариотипированных рыб числом хорошо идентифицируемых хромосом ($2n = 16$), является наиболее удобным объектом для исследования аномалий, как в митозе, так и мейозе. Для этого вида рыб могут быть с успехом применены все цитогенетические тесты, включая анализ

сестринских хроматидных обменов и нарушений спаривания хромосом в мейозе (Крысанов и др., 2018).

Nothobranchius rachovii характеризуется высоким уровнем пролиферации в тканях предпочки, что очень важно при цитогенетическом анализе, поскольку анализ проводят на метафазных клетках. Средняя продолжительность жизни в эксперименте составляет 120 сут. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что в соответствии с рассмотренными требованиями к тест-объектам использование самцов для токсикологических экспериментов предпочтительнее. Кроме того, только для самцов удается получить адекватную информацию о нарушениях в мейозе. Исследование гематологических показателей возможно проводить во всех возрастных группах. Образцы можно получить, отбирая кровь из сердца одновременно с отбором других проб. Образцы крови можно также использовать для учета генетических нарушений, анализируя частоты микроядер.

Используя *N. rachovii* в качестве тест-объекта при проведении параллельных исследований влияния загрязняющих веществ на генетический аппарат, можно получить данные для всех цитогенетических маркеров одновременно. Это позволяет значительно уменьшить количество животных необходимых для экспериментальных процедур, что весьма существенно с этической точки зрения.

Таким образом, при оценке качества окружающей среды с применением цитогенетических маркеров целесообразно использовать двухкомпонентную систему: оценки, полученные в природных популяциях, рекомендуется дополнять лабораторными экспериментами с использованием тест-объекта. Наиболее подходящим лабораторным тест-объектом для оценок цитогенетического гомеостаза являются представители вида *Nothobranchius rachovii*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский И.Б., Брянцева С.А., Ковалева А.М., Урюпова Е.Ф., Гусев С.А., Сергиенко В.И., Матишов Д.Г. Микроядра как маркеры хромосомных изменений клеток // Журн. фундаментальной медицины и биологии. 2012. Т. 1. С. 4–9.
- Ильинских Н.Н., Ксенц А.С., Ильинских Е.Н., Васильев С.А., Манских В.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности. Томск: Национальный исследовательский Томский государственный университет, 2011. 312 с.
- Ильинских Н.Н., Медведев М.А., Бессуднова С.С., Ильинских И.Н. Мутагенез при различных функциональных состояниях организма. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1990. 227 с.
- Крюков В.И. Вариант методики учета ядерных аномалий в эритроцитах птиц // Вестник аграрной науки. 2020. Т. 1(82). С. 81–100.

- Орджоникидзе К.Г., Симановский С.А., Демидова Т.Б., Крысанов Е.Ю. Цитогенетические методы для оценки состояния окружающей среды. – Экологический мониторинг. Часть X / Под ред. Гелашвили Д.Б. Нижний Новгород: Нижегородский университет, 2019. 188 с.
- Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека // Гигиена и санитария. 2012. Т. 6. С. 68–72.
- Grisolia C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research // Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002. V. 518(2). P. 145–150. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00086-4)
- Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh E.N., Ilyinskikh I.N. Infectious mutagenesis: Cytogenetic effects in human and animal cells as well as immunoreactivity induced by viruses, bacteria and helminthes. LAP: Lambert Academic Publishing, 2012. 224 p.
- The Micronucleus Assay in Toxicology. *Issues in Toxicology / Eds Knasmüller S., Fenech M.*; UK: Croydon: CPI Group (UK) Ltd., 2019. № 39. 657 p.
- Koppen G., Azqueta A., Pourrut B., Brunborg G., Collins A.R., Langie S.A.S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop // *Mutagenesis*. 2017. V. 32(3). P. 397–408. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex002>
- Krysanov E.Y. Aneuploidy in postnatal ontogenesis of fishes // *Acta Zool. Fenn*. 1992. V. 191. P. 177–182.
- Krysanov E.Y., Ordzhonikidze K.G., Simanovsky S.A. Cytogenetic indicators in estimation of environmental state // *Russ. J. Dev. Biol*. 2018. V. 49. P. 36–41. <https://doi.org/10.1134/S1062360418010034>
- Mateuca R.A., Decordier I., Kirsch–Volders M. Cytogenetic Methods in Human Biomonitoring: Principles and Uses. // *Genetic Toxicology. Methods in Molecular Biology / Ed. Parry J., Parry E.*; N.Y.: Springer, 2012. V. 817. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-421-6_15
- Ordzhonikidze C.G., Demidova T.B., Krysanov E.Yu. Evaluation of genetic homeostasis in animals at different stages of ontogenesis in the environment // *Russ. J. Dev. Biol*. 2014. V. 45. № 3. P. 134–142. <https://doi.org/10.1134/S1062360414030035>
- van der Gaag M.A., van de Kerkhoff J.F.J. Mutagenicity testing of water with fish: a step forward to a reliable assay // *Sci. Total Environ*. 1985. V. 47. P. 293–298. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(85\)90337-7](https://doi.org/10.1016/0048-9697(85)90337-7)
- Zakharov V.M., Krysanov E.Y., Pronin A.V., Trofimov I.E. Study of developmental homeostasis in natural populations. *Health of environment concept: Methodology and practice of estimation*. *Russ. J. Dev. Biol*. 2017. V. 48. № 6. P. 355–368. <https://doi.org/10.1134/S1062360417060054>
- Zakharov V.M., Trofimov I.E. Developmental Noise and Biological System Condition: Prolegomena // *Symmetry*. 2022. V. 14(11). P. 2380. <https://doi.org/10.3390/sym14112380>

Cytogenetic Homeostasis and Environmental Health (Assessment Practice)

E. Yu. Krysanov^{1, #}, K. G. Ordzhonikidze^{1, 2}, and S. A. Simanovsky¹

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

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

[#]e-mail: krysanov@sevin.ru

The article discusses possible approaches to cytogenetic homeostasis assessment in natural populations. Various cytogenetic methods, their advantages, disadvantages, and limitations related to the study of animals in their natural habitat are considered. For a reliable characterization of environmental quality, it is recommended to supplement the data obtained in natural populations with laboratory experiments using a test object. Due to a number of features, it is proposed to use the short-living fish *Nothobranchius rachovii*.

Keywords: mitosis, meiosis, micronuclei, comet assay, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges