



УДК 575.224.23

## ПРОАПОПТИЧНІ ЗМІНИ В ЕРИТРОЦИТАХ РИБИ *DANIO RERIO* ЗА ВПЛИВУ КАТІОНІВ МІДІ

**М. Р. Верголяс<sup>1</sup>, Р. О. Білий<sup>2</sup>, Р. С. Стойка<sup>2</sup>, В. В. Гончарук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут колоїдної хімії і хімії води ім. А.В. Думанського НАН України  
бульв. акад. Вернадського, 42, Київ 03680, Україна  
e-mail: [vergolyas@meta.ua](mailto:vergolyas@meta.ua)

<sup>2</sup>Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна  
e-mail: [R.Bilyy@nas.gov.ua](mailto:R.Bilyy@nas.gov.ua)

Встановлено, що токсичний ефект катіонів міді водного середовища у концентрації 0,75 мг/л на риб *Danio rerio* протягом чотирьох діб проявляється у зростанні кількості еритроцитів периферичної крові з мікроядрами та подвійними ядрами. Крім того, в еритроцитах спостерігали характерні ознаки апоптозу, зокрема екстерналізацію фосфатидилсерину, визначену за зв'язуванням анексину V, посилення зв'язування галактозоспецифічного лектину RCA та манозоспецифічного лектину NPL, що свідчить про зростання рівня експонування відповідних глікозильних залишків на поверхні клітин, а також міжнуклеосомну фрагментацію ядерної ДНК. Обґрунтовано доцільність використання методів виявлення апоптичних клітин у риб при дослідженні впливу ксенобіотиків на організм.

**Ключові слова:** еритроцити, ДНК, *Danio rerio*, мікроядра, апоптоз, токсичність.

### ВСТУП

Антропогенне забруднення водного середовища зростає з кожним роком. На сьогоднішній день водні токсиканти являють собою суміш відомих токсичних речовин і нових сполук, синтезованих людиною. Багато токсичних речовин є досить стійкими до руйнування і можуть проявляти мутагенну дію [23]. Тому, без сумніву, дослідження генотоксичних властивостей водного середовища є актуальною проблемою.

Риби є зручним об'єктом у водній токсикології, однак методи оцінки впливу антропогенних факторів на морфофункціональні характеристики їхніх клітин не завжди адекватні [17]. Більшість таких досліджень проводять за допомогою мікроядерного тесту, який дає змогу виявляти анеугенні чи кластогенні властивості токсиканта, що міститься у водному розчині. Останнім часом набули значного поширення методи виявлення апоптозу, що відбувається внаслідок негативного хімічного впливу на клітини-мішені [11].

Утворення в клітині мікроядер пов'язують із ушкодженням молекули ДНК і/або хромосомних білків. Мікроядерний тест на рибах є чутливим методом оцінки

генотоксичної дії речовин і вважається перспективним для виявлення такої дії [7, 12]. Серед різних типів клітин риб клітини зябер і еритроцити периферичної крові найчастіше використовують для мікроядерного тесту [2].

Характерною біохімічною ознакою апоптозу на рівні плазматичної мембрани клітин є транслокація молекул фосфатидилсерину із внутрішнього на зовнішній бік цієї мембрани [13]. На поверхні апоптичних клітин фосфатидилсерин розпізнається макрофагами, які у подальшому забезпечують видалення цих клітин, а також апоптичних тілець, з організму [6, 13]. Оскільки фосфатидилсерин специфічно та з високою спорідненістю зв'язується з білком анексином V, було розроблено добре відтворюваний метод виявлення фосфатидилсерину за допомогою анексину V, міченого флуоресцентним барвником [22, 16]. Незважаючи на високу вартість, даний тест досить поширений і став одним із основних способів виявлення апоптозу.

Для виявлення вмираючих клітин із конденсованим і/чи фрагментованим ядром також успішно використовують такі флуоресцентні барвники, як акридинової оранжевий, пропідію йодид, DAPI, Хехст 33342, котрі стехіометрично зв'язуються з ДНК клітини. Внаслідок змін у проникності плазматичної мембрани такі клітини накопичують вказані флуорохроми швидше, ніж інтактні клітини.

Ще однією з характерних біохімічних ознак апоптозу є міжнуклеосомне розщеплення ендонуклеазами двоспиральної ядерної ДНК. В апоптичних клітинах виявляють одониткові розриви ДНК, деградацію ДНК на порівняно великі фрагменти (50–300 тис. п.н.) і міжнуклеосомне розщеплення ДНК на фрагменти, довжина яких кратна 180–200 п.н. Олігонуклеосомні фрагменти володіють значно більшою, ніж високомолекулярна ДНК, рухливістю при електрофорезі в агарозному гелі та за присутності етидію броміду виявляються в ультрафіолетовому світлі у вигляді так званої „драбини” ДНК. У некротичних клітинах розщеплення ДНК переважно відбувається з утворенням випадкового набору низькополімерних фрагментів, які на електрофореграмі мають форму дифузної плями ДНК [5].

Лектини – це вуглевод-зв'язувальні білки із різною специфічністю до вуглеводів. Лектини широко використовують у гістології й цитології для ідентифікації вуглеводних компонентів плазматичної мембрани та інших клітинних структур [9]. Встановлено [5, 8, 10, 15], що апоптичні клітини характеризуються збільшеним рівнем експонування певних мембранних глікопротеїнів (ГП), а відповідні лектини можна успішно використовувати для виявлення апоптичних клітин *in vitro*. Було доведено, що підвищення рівня експресії манозо- та галактозовмісних глікопротеїнів може слугувати маркером апоптозу як *in vitro*, так і *in vivo*.

У даній роботі проаналізовано можливості використання перелічених вище методів виявлення апоптозу на клітинах крові риб паралельно з загальновідомим мікроядерним тестом, який застосовують для біотестування зразків проб води на наявність у ній токсичних домішок.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були риби *Danio rerio Hamilton 1822*, яких утримували в акваріумах лабораторії біомаркерів та біотестування Інституту колоїдної хімії і хімії води ім. А. В. Думанського НАН України, м. Київ. Для роботи відбирали особини вагою 1–2 г і довжиною 35–45 мм. У кожній групі було по вісім тварин. Вміст міді ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) у воді становив 0,75 мг/л. Ця концентрація була найвищою концентрацією, що не викликала загибелі риб даного виду впродовж 96 год [17].

Під час проведення експерименту контрольну групу особин риб поміщали у відстояну протягом 48 год водопровідну воду на чотири доби. Особин дослідної групи поміщали на чотири доби у таку ж воду, що містила 0,75 мг/л міді (у формі сульфату). Риби піддослідної і контрольної груп перебували у стандартних для даного виду умовах: температура води становила  $+23\pm 1^\circ\text{C}$ , значення рН – у межах 7,7–8,2, в акваріумах проводили постійну аерацію за допомогою мікрокомпресора. Риб годували 2 рази на добу живими артеміями. У роботі з тест-організмами дотримувались етичних норм і правил роботи з хребетними тваринами.

Після закінчення інкубації від кожної особини після декапітації забирали зразки крові у пробірки з гепарином.

Для здійснення мікроядерного аналізу робили стандартні мазки крові, які фіксували 96%-м етиловим спиртом протягом 30 хв і висушували. Одержані цитологічні препарати фарбували за методикою Паппенгейма-Крюкова, що полягає у комбінованій обробці мазків розчином Мая-Грюнвальда та 2%-м розчином Романовського-Гімзи і дає можливість краще диференціювати структуру клітин [4]. Препарати аналізували під світловим мікроскопом із загальним збільшенням  $\times 1000$ . Кількість клітин, підданих мікроядерному аналізу, становила 3 000 для кожної особини риби.

Для дослідження флуоресценції використовували епіфлуоресцентний мікроскоп Zeiss Axiolmager A1 (фірма Zeiss, Німеччина), обладнаний оптикою диференційного інтерференційного контрасту (DIC) та камерою AxioCam MRm. У роботі використовували такі флуоресцентні сполуки:

- 1) пропідію йодид (довжина хвилі збудження 536 нм та емісії 617 нм) – для виявлення клітин із пошкодженою (проникною) плазматичною мембраною, робоча концентрація 0,5 мкг/мл;
- 2) FITC-мічений кон'югат Анексину V (довжина хвилі збудження FITC – 494 нм та емісії 518 нм), робоча концентрація 1 мкг/мл.

Виявлення олігонуклеосомних фрагментів ДНК проводили за стандартною методикою [17]. Виділену ДНК піддавали електрофорезу в 1% (в/о) гелі агарози, використовуючи Трис-ацетатний електродний буфер (рН 8,0) з додаванням етидію броміду. Зони ДНК знаходили за їх свіченням в ультрафіолетовому світлі, використовуючи трансільюмінатор.

У дослідженні використовували лектини RCA та NPL, які було виділено й очищено афінною хроматографією в лабораторії Інституту біології клітини НАН України к. фарм. н. В. О. Антонюком за відповідними методиками [1]. Лектини було кон'юговано із пероксидазою хрому (HRP) за стандартною методикою [16].

Лектиноцитохімічний аналіз із використанням ферментативних кон'югатів лектинів здійснювали, як описано раніше [15], з деякими змінами. Денситометрію вологих препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа Zeiss AxiolmagerA1 (Німеччина), обладнаного цифровою камерою Canon (Японія).

Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel 2003, достовірність змін визначали за  $\phi$ -критерієм Фішера.

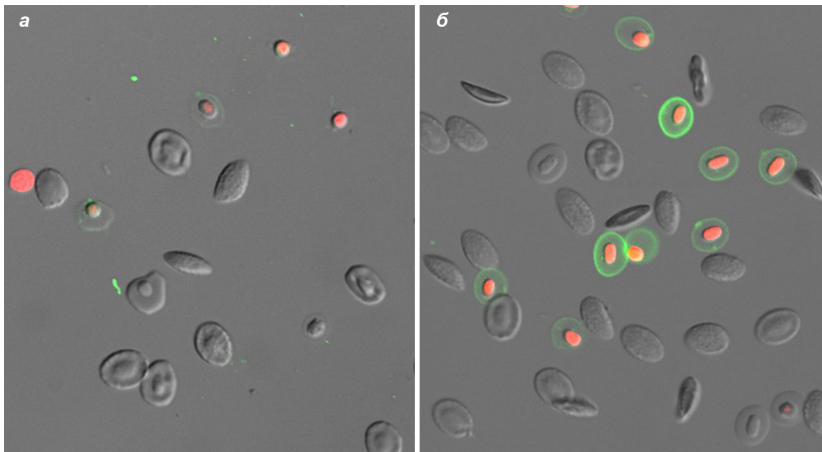
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

У ході проведеного дослідження при інкубації риб у контролі та експериментальному середовищі із додаванням катіонів міді нами не виявлено загибелі риб

чи видимих ознак гострої інтоксикації. Зовнішній вигляд і поведінка риб у контролі та дослідних групах не відрізнялися.

Мікроядерний аналіз еритроцитів периферичної крові риб дослідних груп, які зазнавали впливу іонів міді, дав змогу виявити підвищений вміст еритроцитів із мікроядрами та подвійними ядрами. Спостерігалось зростання обох зазначених параметрів з  $0,13 \pm 0,10\%$  у контролі до  $1,88 \pm 0,95\%$  у досліді для еритроцитів, які містили мікроядра, та від  $0,25 \pm 0,24\%$  до  $3,88 \pm 1,36\%$  для еритроцитів із подвійними ядрами ( $p < 0,05$ ).

Флуоресцентна мікроскопія клітин крові риб контрольної групи та риб, які зазнали дії катіонів міді, дала змогу виявити зростання рівня екстерналізації фосфатидилсерину на плазматичній мембрані цих клітин за дії катіонів міді (якщо оцінювати за зв'язуванням анексину V). Одночасно в анексин-позитивних клітинах, які за морфологічними ознаками були ідентифіковані як еритроцити, спостерігалось інтенсивне фарбування ядер пропідію йодидом, що свідчить про порушення цілісності плазматичної мембрани, а отже, і про порушення життєздатності цих клітин (рис. 1). Таке фарбування ядер еритроцитів пропідію йодидом можна пояснити відсутністю в мембранах цих клітин специфічних білків-транспортів, які видаляють даний барвник з клітин.



**Рис. 1.** Флуоресцентна мікроскопія після фарбування клітин крові інтактних риб (а) і риб, що зазнали дії катіонів міді у концентрації 0,75 мг/л упродовж 96 год (б) за допомогою пропідію йодиду (червоний колір) і анексину (зелений колір)

**Fig. 1.** Fluorescent microscopy of erythrocytes of intact fish (a) and fish exposed for 96 h to 0.75 mg/L copper cations (b) staining with propidium iodide (red) and annexin V (green)

Виявлення олігонуклеосомних фрагментів ядерної ДНК (характерна ознака апоптозу) свідчить про фрагментацію ДНК клітин крові риб за умов дії на них катіонів міді (рис. 2). У інтактних риб такої фрагментації ядерної ДНК не спостерігалось.

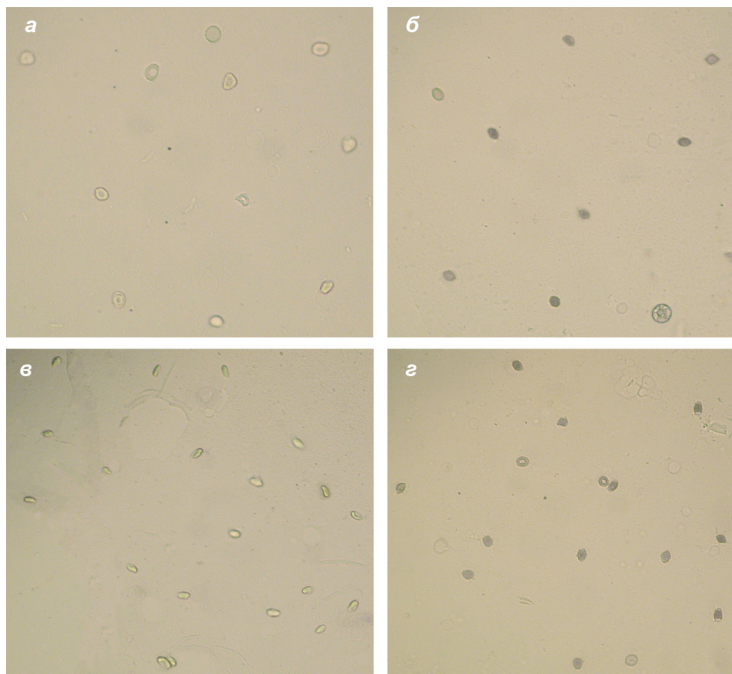
Лектиноцитохімічний аналіз клітин крові інтактних риб і риб, які упродовж 96 год зазнали впливу катіонів міді в концентрації 0,75 мг/л, виявив суттєве посилення зв'язування клітинами останніх лектину RCA (рис. 3, а, б). Це свідчить про зростання рівня експонування галактозильних залишків цими клітинами. В останніх також має місце зростання рівня експонування на поверхні манозильних залишків, на що вказує посилене зв'язування манозоспецифічного лектину NPL (рис. 3, в, г).



**Рис. 2.** Електрофорез ДНК клітин крові інтактних риб (1) і риб, що зазнали дії катіонів міді (0,75 мг/л упродовж 96 год) (2)

**Fig. 2.** DNA electrophoresis of blood cells of intact fish (1) and fish exposed for 96 h to 0.75 mg/L copper cations (2)

У наукових публікаціях останніх років описано генотоксичний і мутагенний вплив катіонів міді на клітини тварин та рослин [3, 20, 21]. Результати нашого дослідження не лише підтвердили таку їхню дію на структурні компоненти ядра, але й продемонстрували зручність експериментальної моделі еритроцитів риб для її виявлення. Встановлено, що використана нами концентрація катіонів міді не викликає гострого токсичного ураження риб, однак призводить до підвищення кількості еритроцитів зі суттєвими морфологічними порушеннями ядра. Крім того, під впливом катіонів міді в цих клітинах відбувається активація процесів апоптозу, що дає змогу припустити, що саме апоптоз забезпечує елімінацію даних клітин в організмі риб. Дане припущення узгоджується з результатами інших дослідників [14]. Аналіз генетичних ушкоджень у клітинах різних органів і тканин тварин під впливом токсичного ураження дає змогу оцінити не лише рівень токсичного впливу, але й



**Рис. 3.** Лектиноцитохімічний аналіз клітин крові інтактних риб (а, в) і риб, які зазнали дії катіонів міді у концентрації 0,75 мг/л упродовж 96 год (б, г). а, б – зв'язування лектину RCA, кон'югованого пероксидазою хрому, в, г – зв'язування лектину NPL, кон'югованого з пероксидазою хрому

**Fig. 3.** Lectinocytochemical analysis of blood cells of intact fish (a, в) and fish exposed for 96 h to 0.75 mg/L copper cations (б, г). а, б – staining with peroxidase-conjugated RCA lectin; в, г – staining with peroxidase-conjugated NPL lectin

можливі наслідки цього впливу на організм. Процеси утворення мікроядер і запуску апоптозу можуть бути взаємозалежними ланками одного ланцюга токсичного ураження, що виявляється на цитогенетичному рівні [11].

## ВИСНОВКИ

Встановлено, що токсичний ефект катіонів міді у воді проявляється у зростанні кількості еритроцитів периферичної крові з мікроядрами та подвійними ядрами. Одночасно в даних клітинах спостерігали значну активацію процесів апоптозу, що вказує на доцільність визначення клітин у стані апоптозу під час дослідження впливу токсичних речовин на організм риб.

1. Антонюк В. О. **Лектини та їх сировинні джерела**. Львів: Кварт, 2005. 554 с.
2. Верголяс М. Р., Кучеренко Т.В., Архипчук В.В. **Сравнительный анализ частоты проявления клеток с микроядрами и двойными ядрами у карася *Carassius auratus* в природных и лабораторных условиях**. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць. Київ: ЛОГОС, 2007; 1: 203-206.
3. Гончарук В.В., Верголяс М.Р., Веялкина Н.Н. **Оценка генотоксического влияния тяжелых металлов на клетки рыб**. Збірник наукових праць Вінницького державного аграрного університету. Вінниця, 2008; 34(1): 171–176.

4. Козинец Г.И., Макаров В. А. **Исследование системы крови в клинической практике.** М.: Триада-Х, 1997. 480 с.
5. Фильченков А. А. **Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии.** Київ: ДІА, 2003. 76 с.
6. Allen T.M., Austin G.A., Chonn A. et al. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. **Biochim. Biophys. Acta**, 1991; 1061 (1): 56–64.
7. Arkhipchuk V.V., Garanko N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2005; 62: 42–52.
8. Bilyy R., Stoika R. Search for novel cell surface markers of apoptotic cells. **Autoimmunity**, 2007; 40: 249–253.
9. Bilyy R. O., Antonyuk V. O., Stoika R. S. Cytochemical study of role of alpha-d-mannose- and beta-d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. **J. Mol. Histol**, 2004; 35: 829–838.
10. Bilyy R.O., Stoika R.S. Lectinocytochemical detection of apoptotic murine leukemia L1210 cells. **Cytometry**, 2003; 56 A: 89–95.
11. Decordier I., Dillen L., Cundari E., Kirsch-Volders M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. **Mutagenesis**, 2002; 17(4): 337–344.
12. Ergene S., Cavaş T., Celik A. et al. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environ. Mol. Mutagen**, 2007; 48 (6): 421–429.
13. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol**, 1992; 148 (7): 2207–2216.
14. Fimognari C., Nüsse M., Cesari R. et al. Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes. **Mut. Res**, 2001; 495: 1–9.
15. Franz S., Herrmann K., Fuhrnrohr B. et al. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. **Cell Death. Differ**, 2007; 14: 733–742.
16. Hermanson G. T. **Bioconjugate Techniques.** San Diego, CA, USA: Academic Press, 1996. 785 p.
17. Hernández P. P., Allende M. L. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for studying the genetic basis of copper toxicity, deficiency, and metabolism. **American Journ. of Clinical Nutrition**, 2008; 88 (3): 835–839.
18. Herrmann M., Lorenz H.M., Voll R. et al. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. **Nucleic Acids Res**, 1994; 22: 5506–5507.
19. Huang D., Zhang Y., Wang Y. et al. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. **Mutat. Res**, 2007; 629: 81–88.
20. Mediouni C., Houlné G., Chabouté M.-E. et al. Cadmium and copper genotoxicity in plants. **Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance.** Basel: Birkhäuser, 2008. 325–333.
21. Prá D., Franke S. I., Giulian R. et al. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. **Bio. Metals**, 2008; 21 (3): 289–297.
22. Reutelingsperger C.P., van Tilborg G.A., Mulder W.J. et al. Annexin A5-Functionalized Bimodal Lipid-Based Contrast Agents for the Detection of Apoptosis. **Bioconjug. Chem**, 2006; 17 (3): 741–749.
23. Waters M.D., Stack H.F., Jackson M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutat. Res**, 1999; 437: 21–49.

## PROAPOPTOTIC CHANGES OF ERYTHROCYTES *DANIO RERIO* INFLUENCED BY COPPER CATIONS

**M. R. Vergolyas<sup>1</sup>, R. O. Bilyy<sup>2</sup>, R. S. Stoika<sup>2</sup>, V. V. Goncharuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Colloid Chemistry and Chemistry of Water named after A. V. Dumansky of NAS of Ukraine  
42, Blvd. of akad. Vernadskyi, Kyiv 03680, Ukraine*

<sup>2</sup>*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

Toxic effect of the cations of copper of aquatic surrounding in the concentration 0,75 mg/l during four days on *Danio rerio* fishes is revealed as the increase in the amount of erythrocytes of peripheral blood with micronucleus and double nuclei. In addition, the characteristic signs of apoptosis in blood cells were observed, particularly externalization of phosphatidyl serine, determined by annexin V staining, increase in the intensity of binding of galactose-specific RCA lectin and mannose-specific NPL lectin, suggesting the increase of the level of exposure for corresponding surface glycoside residues on the cell surface, and also internucleosomal DNA fragmentation. The importance of the utilization of the methods of the apoptotic cells detection in fish for the study of xenobiotic influence on the organism was proved.

**Key words:** erythrocytes, DNA, *Danio rerio*, micronuclei, apoptosis, toxicity.

## ПРОАПОПТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ РЫБ *DANIO RERIO* ПРИ ВЛИЯНИИ ИОНОВ МЕДИ

**М. Р. Верголяс<sup>1</sup>, Р. О. Білий<sup>2</sup>, Р. С. Стойка<sup>2</sup>, В. В. Гончарук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского НАН Украины  
бульв. акад. Вернадского, 42, Киев 03680, Украина*

<sup>2</sup>*Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина*

Установлено, что токсический эффект катионов меди водной среды в концентрации 0,75 мг/л на рыб *Danio rerio* на протяжении четырех суток проявляется в увеличении количества эритроцитов периферической крови с микроядрами и двойными ядрами. Кроме того, в эритроцитах наблюдали характерные признаки апоптоза, в частности экстернализацию фосфатидилсерина, установленную по связыванию аннексина V, усиление связывания галактозоспецифического лектина RCA и манозоспецифического лектина NPL, что свидетельствует о росте уровня экспонирования соответствующих гликозильных остатков на поверхности клетки, а также междунуклеосомную фрагментацию ядерной ДНК. Обоснована целесообразность использования методов определения апоптотических клеток у рыб при исследовании влияния ксенобиотиков на организм.

**Ключевые слова:** эритроциты, ДНК, *Danio rerio*, микроядра, апоптоз, токсичность.

Одержано: 28.08.2009