

## ВИДОСПЕЦИФІЧНІСТЬ МІНЛИВОСТІ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ССАВЦІВ, ЯКІ ВІДТВОРЮЮТЬСЯ В РІЗНИХ РАДІОЕКОЛОГІЧНИХ УМОВАХ

**С.О. Костенко**

Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
кафедра генетики, розведення і біотехнології відтворення тварин ім. М.А.Кравченка,  
e-mail: swetakostenko@mail.ru

Проведено цитогенетичний аналіз тварин великої рогатої худоби, свині свійської та звичайних полівок, що відтворюються в різних радіоекологічних умовах. Показано, що підвищення частоти клітин з мікроядрами та анеуплоїдією є невидоспецифічною реакцією каріотипу на вплив низькодозового іонізуючого опромінення в усіх досліджених видів. Для звичайних полівок характерне підвищення частоти клітин з асинхронним розщепленням центромер. Свиня свійська характеризується самим нестабільним каріотипом серед досліджених видів.

**Ключові слова:** іонізуюче опромінення, мікроядро, хромосомні аберації, хроматидні аберації, анеуплоїдія, *Microtus arvalis*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*.

**Kostenko S.O. Species specificity of mammal cytogenetic characteristics variations in different radio-ecological conditions.** *It was conducted that cytogenetic analysis of animals in cattle, pigs and domestic common voles, reproducible in different radioecological conditions was carry out. No species specificity karyotype reaction to low-dose ionizing radiation exposure in all studied species is increase in the frequency of cells with micronuclei and aneuploidy. Increase in the frequency of cells with centromere premature cleavage is characteristic of common voles karyotype. Domestic pig is characterized by the unstable karyotype among the studied species.*

**Key words:** chronic low doses of irradiations, micronuclei, chromosome aberrations, chromatide aberrations, aneuploidy, *Microtus arvalis*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*.

### Вступ

Серед проблем, пов'язаних з охороною навколишнього середовища в умовах енергомістких технологій та техногенного забруднення, особливої уваги набули питання оцінки, прогнозування та запобігання генетичних наслідків змін середовища, зокрема радіоактивного забруднення. Параметри соматичного мутагенезу традиційно використовують з метою біоіндикації мутагенного впливу генотоксичних факторів середовища, лікарських препаратів, тощо [1]. Свійські тварини є невід'ємною частиною агроєкосистем, генетичний моніторинг яких має як теоретичне, так і прикладне значення. Мишоподібні гризуни є зручним тестерним об'єктом для вивчення впливу іонізуючого опромінення на ссавців.

Тому метою роботи був аналіз видоспецифічності дестабілізації каріотипів різних видів ссавців в умовах низькодозового іонізуючого опромінення.

### Матеріали і методи

Для аналізу багаторічної динаміки цитогенетичних параметрів були використані результати досліджень полівок-скономок (n=61), звичайних полівок (n=48), свиней свійських (n=35), великої рогатої худоби (n=78).

Цитогенетичні препарати звичайних полівок (*Microtus arvalis* (Pallas, 1779), 2n=46), відловлених у 1985 р. в Київській обл., були люб'язно надані к.б.н., доц. Загороднюком. Цитогенетичні препарати тварин, відловлених в районі Чистогалівки (близько 300 Ки/км<sup>2</sup> – 1996, 2001рр.) в с. Роз'їзжому (1-20 Ки/км<sup>2</sup> - 1997р.) після Чорнобильської аварії, а також дані по рівню забруднення радіонуклідами були надані старшим науковим співробітником Міжнародного Наукового Чорнобильського центру к.б.н. Бунтовою О. Г.

Дослідження *Bos taurus* (Bt) проводили на коровах української чорнорябої молочної породи, а *Sus scrofa* (Ss) на свиноматках великої білої породи, які є найбільш розповсюдженими в Україні. Корови утримувались в наступних господарствах Київської області: СГВК «Мрія» с. Горностайпіль, Іванківського району (6 гол.), СГВК ім. Мічуріна с. Дитятки Іванківського р-ну (14 гол.), що знаходяться в зоні дії хронічного низькодозового іонізуючого опромінення (24-96 мкР/год.), та СВК ім. Щорса Білоцерківського р-ну (24 гол.), СТОВ «Агросвіт» Миронівського р-ну (28 гол.), ТОВ «Княжичі» Броварського р-ну (6 гол.)

знаходяться на територіях з експозиційною дозою опромінення 11-13 мкР/год. Свиноматки утримувались в господарствах: СТЗОВ «Дружба» Ковельського р-ну Волинської області (10 гол), ДП Агроінвест Чернігівської області (10 гол), ТОВ «Луговське» Дніпропетровської області (10 гол, 11-15 мРн/год) та ТОВ «Шпиль» Іванківського р-ну Київської області (15 гол, 96 мРн/год).

У тварин досліджували наступні цитогенетичні характеристики: анеуплоїдія, поліплоїдія, частота метафаз з хромосомними абераціями (хромосомні, хроматидні розриви, фрагменти, кільцеві хромосоми) і асинхронністю розщеплення центромірних районів хромосом (АРЦРХ). Частоти метафаз з хроматидними і хромосомними розривами, а також з фрагментами і АРЦРХ розраховували відносно всієї вибірки проаналізованих метафаз.

Кількість двоядерних лімфоцитів (ДЯ) і лімфоцитів з мікроядрами (МЯ) підраховували на цих же препаратах в клітинах із збереженою цитоплазмою. Мітотичний індекс (МІ), частоту ДЯ, МЯ розраховували на 1000 клітин.

Препарати клітин кісткового мозку полівок готували за стандартною методикою без попереднього введення колхіцину. Із стегнової кістки полівок гіпотонічним розчином КСІ (0,54%) вимивали кістковий мозок. Клітини суспендували і інкубували 40 хвилин в гіпотонічному розчині при 37°C в термостаті. Фіксацію проводили сумішшю метилового спирту і льодяної оцтової кислоти (3:1), тричі змінюючи фіксуючий розчин. Препарати розкапували на знежирені охолоджені мокрі скельця. Висушували на повітрі і фарбували по Гімза-Романовському ("Merck", Німеччина).

Цитогенетичні перпарати *Sus scrofa* та *Bos taurus* готували за стандартною методикою [2]. Фарбовані цитогенетичні препарати аналізували за допомогою бінокулярного мікроскопу Karl Ceiss при збільшенні в 1000 разів.

### Результати та обговорення

Показники цитогенетичної мінливості тварин, представлені на рисунку 1, свідчать про те, що за дії хронічного низькодозового опромінення досліджені тварини характеризуються видоспецифічними особливостями дестабілізації каріотипу.

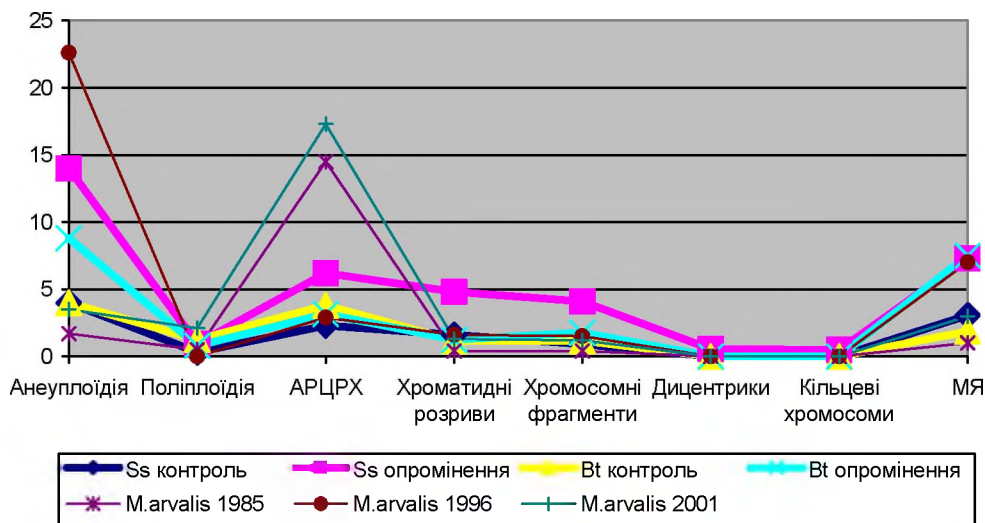


Рис.1. Показники цитогенетичної мінливості тварин видів *Microtus arvalis*, *Sus scrofa* і *Bos taurus* в різних радіоекологічних умовах.

Якщо контрольні показники соматичного мутагенезу полівок, свиней, і корів знаходяться в межах спонтанної мінливості, характерної для ссавців в умовах відсутності генотоксичного впливу факторів мутагенезу [1; 4], то за дії хронічного низькодозового опромінення спостерігаються яскраво виражені відмінності.

Це стосується більш високого рівня частот метафаз з анеуплоїдією, АРЦРХ, хромосомними та хроматидними розривами у *Sus scrofa* в умовах хронічного низькодозового іонізуючого опромінення. У свиней були також виявлені метафази з дицентричними та кільцевими хромосомами, наявність яких вважають цитогенетичними індикаторами іонізуючого опромінення. Що стосується частоти клітин з мікроядрами, то її підвищення було характерним для трьох досліджених видів. Також було виявлено статистично достовірне підвищення рівня клітин з анеуплоїдією в порівнянні з контролем, як у *Sus scrofa*, *Bos taurus* так і у *Microtus arvalis*. Кореляційний аналіз між кількістю клітин з анеуплоїдією та мікроядрами виявив статистично достовірний позитивний зв'язок, який зростав в умовах хронічного низькодозового опромінення від 0,45 (*S. scrofa*) та 0,62 (*B. taurus*) до 0,96(*S. scrofa*) та 0,7 (*B. taurus*), 0,61 (*M. arvalis*).

Таким чином, можна припустити, що підвищення частоти мутантних клітин в умовах хронічного низькодозового опромінення в переважній більшості відбувається за рахунок втрат окремих хромосом у тварин двох досліджених видів

Цитогенетичні показники звичайних полівок, відловлених після аварії суттєво відрізнялися від тварин, відловлених у 1985 році. Найбільшою частотою анеуплоїдних метафаз характеризувалися тварини, відловлені у 1996 році в найбільш забрудненому районі відлову – Чистогалівці. Зважаючи на те, що за 1996-2001 роки рівень радіонуклідного забруднення не змінився, кількість клітин з анеуплоїдією вірогідно зменшилася, можна припустити, те що відбувся відбір більш радіорезистентних особин.

Вибірки тварин, відловлених у 30-км зоні ЧАЕС, статистично не відрізнялися за кількістю двоядерних клітин. Кількість клітин з мікроядрами у тварин, відловлених у 2001 році, відповідала кількості клітин у тварин, відловлених у 1997 році в зоні умовного контролю і була вірогідно нижчою, ніж показники 1996 року.

Знайдений кореляційний зв'язок ( $r = 0,68$ ) між числом клітин з МЯ та анеуплоїдією і виявлені клітини з пошкодженням центромерного району у полівок, відловлених у 1996 році. Достовірне зменшення кількості одноядерних лімфоцитів з мікроядрами, яке спостерігалось у тварин, відловлених у 2001 р., відповідало зменшенню частоти анеуплоїдних клітин. Таким чином, можна зробити припущення, що це зниження відбулось за рахунок зменшення частки анеуплоїдних клітин, а основний вклад у мікроядра у звичайних полівок вносили цілі хромосоми. Враховуючи знайдені метафазні пластинки з порушеннями центромерних ділянок, а також те, що вид звичайна полівка характеризується хромосомною нестабільністю, можна зазначити, що центромерні ділянки хромосом – «гарячі точки» у каріотипі *Microtus arvalis*.

Частота метафазних пластинок з хромосомними аберациями *Microtus arvalis* відповідала рівню, характерному для тварин, що відтворюються в індустріально забруднених регіонах.

Порівняно з 1996 р., у 2001 р у *Microtus arvalis* спостерігалось статистично достовірне ( $P < 0,001$ ) зниження темпів ділення клітин, а також зменшення частоти лімфоцитів з мікроядрами. Співвідношення кількості клітин, що діляться до двоядерних лімфоцитів у тварин, відловлених 1996 р., варіює від 0,8 до 1,5. Це може бути свідком того, що клітинний цикл не гальмується на стадії телофази, немає затримки цитокінезу. По цьому параметру вибірка тварин, відловлених у 2001 р. більш гетерогенна. Співвідношення МІ/ДЯ варіює від 0,22 до 8,7. У чотирьох із 16 тварин спостерігалось збільшення кількості ДЯ порівняно з МІ більш ніж у 2 рази. Таким чином, у тварин, відловлених у 2001 р., спостерігалось зниження середнього значення мітотичного індексу. У 25% тварин спостерігалась затримка цитокінезу.

Порівняно з 1996 р. у половини тварин, відловлених в 2001 р., були виявлені поліплоїдні клітини. У деяких особин, серед клітин що діляться, 25% складала анафази. У тварин, відловлених в 1996 р. цей показник склав 1-2%. Статистично достовірно порівняно з 1996 р. у полівок, відловлених в 2001 р., збільшилось число метафаз з асинхронним розщепленням центромерних районів хроматид.

Затримка цитокінезу – збільшення числа ДЯ, анафаз і поліплоїдних клітин, а також клітин з асинхронним розщепленням центромерних районів хромосом може вказувати на те, що у полівок, відловлених в 2001 р., проходило порушення роботи клітинних структур, що забезпечують поділ клітин.

Порушення процесів поділу клітин кісткового мозку – зниження МІ, підвищення частоти метафаз з асинхронним розщепленням центромерних районів хромосом, полиплоїдій, частки анафаз та ДЯ без підвищення ХА і анеуплоїдії є доказом того, що ці порушення не пов'язані напряду з власне генетичним матеріалом, що в стадії мітотичного ділення знаходиться в компактному стані. Можливо, порушення відбуваються на рівні клітинних структур, що забезпечують успішний мітоз за рахунок блокування або зниження активності певних ферментів і це вже є результатом реалізації змін, які відбувалися раніше.

Відмінності реактивності каріотипу на вплив хронічного іонізуючого опромінення можуть бути обумовлені різними причинами. Це стосується як особливостей каріотипу [4], так і роботи репаративної, імунної систем [1], ефективності функціонування імплантаційного бар'єру [4], експресії генів [5], тощо. Одним з аспектів, який розглядається у зв'язку з видоспецифічністю відповіді на іонізуюче опромінення, є відмінності репродуктивного потенціалу тварин. Слід зазначити також те, що у *Microtus arvalis*, *Sus scrofa* значно швидше, ніж у *Bos taurus* відбувається зміна поколінь. Одноплідні тварини на відміну від багатоплідних характеризуються нижчим рівнем мінливості, що може бути обумовлено більш суворим тиском відбору [6]. Порівняння частоти народження тварин-носіїв конститутивних порушень каріотипу серед свиней та великої рогатої худоби свідчить, про те, що види суттєво відрізняються. Якщо для *Bos taurus* у переважній більшості діагностуються лише Робертсонівські транслокації, у які залучена переважно перша хромосома (Rb 1;29) та інверсії, а також анеуплоїдії статевих хромосом, то у *Sus scrofa* виявлено залучення у перебудови усіх хромосом каріотипу. Поширення Rb 1;29 серед м'ясних порід великої рогатої худоби носить дискусійний характер, на думку одних вчених мова йде про те, що бугаї-плідники її отримують від матерів, які не були каріотиповані, інші не виключають виникнення цих транслокацій *de novo* [7]. У *Sus scrofa* 0,4% молодих кнурців є носіями конститутивних порушень каріотипу, які виникли *de novo* [8]. Каріотип *M. arvalis* характеризується значною мінливістю. Для цього виду описані як внутрішній популяційний поліморфізм однієї з великих пар ауто сом [9], так і географічна мінливість каріотипу, пов'язана з варіаціями в будові дрібних елементів набору та кількістю локалізованих в них блоків

гетерохроматину [10]. На Україні *M. arvalis* s. str. знайдені двох каріотипових форм [10]: “obscurus” – в Гірському Криму [11-13], “arvalis” широко розповсюджені на всій території України. Таким чином, можна припустити, що каріотип як полівок, так і свиней характеризується меншою стабільністю. Каріотипові нестабільність *S. scrofa* та *M. arvalis* може бути обумовлена наявністю ламких (фргільних) сайтів, знаходження яких асоційоване з контрольними точками еволюційних подій [14].

### Висновки

Отже, серед показників соматичного мутагенезу у *Microtus arvalis*, *Sus scrofa* та *Bos taurus* підвищення частоти анеуплоїдних та мікроядерних клітин в умовах хронічного низькодозового опромінення є невидоспецифічною реакцією каріотипу. Переважна більшість клітин з мікроядрами у досліджених видів утворюється за рахунок анеуплоїдії. У *Sus scrofa* на відміну від *Bos taurus* спостерігається підвищення частоти клітин з АРЦРХ, хромосомними і хроматидними фрагментами, дицентричними та кільцевими хромосомами. Реактивність показників соматичного мутагенезу в умовах хронічного низькодозового опромінення відзеркалює швидкість еволюційних змін та стабільність каріотипу виду.

Щиро вдячна своїм аспірантам Джус П.П., Коновал О.М., Стародуб Л.Ф., Сидоренко О.В., Куриленко Ю.Ф., Федорві О.В. за допомогу у виконанні експериментальної частини роботи та с.н.с. Тряпичній Н.В. за слушні зауваження за рецензування.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України.

### Література

1. Ильинских Н.Н. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет / Н.Н.Ильинских, И.Н.Ильинских, Б.Ф.Бочаров // Новосибирск : Наука, 1984. – 256 с.
2. Костенко С.О. Видоспецифичность дестабилизации каріотипа в условиях радионуклидного загрязнения (ЧАЭС) у полевок *Microtus oeconomus*, *Microtus arvalis*, *Clethrionomys glareolus* / С.О.Костенко, Т.Т.Глазко, Е.Г.Бунтова // Цитология і генетика. – 2001. – Т. 35, № 2. – С. 11 - 18.
3. Шельов А. В. Методика приготування метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові тварин / А. В. Шельов, В.В. Дзіцюк // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві : наук. зб. – К., 2005. – С. 210 - 213.
4. Эрст Л. К. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции / Л.К.Эрст, А.И.Жигачев. – М., 2006. – 383 с.
5. Дуплій Д. Р. Взаємозв'язок нуклеотидного складу послідовностей генома людини зі структурою та особливостями експресії генів / Дуплій Діана Ростиславівна : автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія; Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 2010. – 21 с.
6. Моссэ И.Б. Существуют ли радиационно-индуцированные мутации у человека? / И.Б.Моссэ // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / НАН України, УААН України, НАМН України, Укр. Товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавілова; [редкол.]; за ред. В.А. Кунах. – К.: Логос, 2011. – Т. 10. – С. 124 – 128.
7. Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview / A. Ducos, T. Revay, A. Kovacs, A. Hidas, A. Pinton, A. Bonnet-Garnier, L. Molteni, E. Slota, M. Switonski, M.V. Arruga, W.A. van Haeringen, I. Nicolae, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, M. Andersson, L. Iannuzzi // Cytogenet Genome Res. - 2008, № 120. – P. 26 - 41.
8. Chromosomal control of pig populations in France: 2002-2006 survey / Ducos A., Berland H.M., Bonnet N., Calgario A., Bil-loux S. et al // Genet Sel Evol. – 2007, Vol.39. – P. 583-597
9. Наследуемая хромосомная нестабильность у обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) из района Кыштымской ядерной аварии - факт или гипотеза? / [Гилева Э.А., Любашевский Н.М., Стариченко В.И., Чибиряк М.В., Романов Г.Н.] // Генетика. – 1996. – Т.32, № 1. – С. 114 - 119.
10. Малыгин В.М. Сравнительный морфометрический анализ каріотипов двух географических форм 46-хромосомной обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) / В.М. Малыгин // Зоологический журнал. – 1974. – 53, № 5. – С. 769 - 778.
11. Загороднюк И.В. Каріотипическая изменчивость 46-хромосомных форм полевок группы *Microtus arvalis* (Rodentia): таксономическая оценка / И.В.Загороднюк // Вестник зоологии. – 1991. – № 1. – С. 36 - 45.
12. Загороднюк И.В. Каріотипическая изменчивость и систематика серых полевок (Rodentia, Arvicolini). Сообщение 1. Видовой состав и хромосомные числа / И.В.Загороднюк // Вестник зоологии. – 1990. – № 2. – С. 26 - 37.
13. Загороднюк И.В. Пространственно-каріотипическая дифференциация серых полевок (Arvicolini, Rodentia) / И.В.Загороднюк // Зоологический журнал. – 1991. – Т.70. – Вып.1. – С. 99 - 110.
14. Picone B. Reconstructing the phylogeny of the human chromosome 4 synteny using comparative karyology and genomic data analysis / Picone Barbara, Luca Sineo // Cariologia. – 2010. – Vol. 63, № 3. – P. 314 - 334.

Стаття поступила до редакції 14.10.2012 р.; прийнята до друку 24.10.2012. р