



ИЗМЕНЧИВОСТ НА ЦИТОГЕНЕТИЧНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ НА СОМАТИЧНАТА МУТАГЕНЕЗА ПРИ РАЗЛИЧНИ ПОРОДИ КОНЕ
ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОМАТИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА РАЗНЫХ ПОРОД ЛОШАДЕЙ
THE SOMATIC MUTAGENIZE POLYMORPHISM OF HORSES BREEDS

Павлина Джус¹, Любовь Стародуб¹, Юрий Куриленко², Светлана Костенко^{2*}
Павлина Джус¹, Любовь Стародуб¹, Юрий Куриленко², Светлана Костенко^{2*}
Pavlina Djus¹, Ljubov Starodub¹, Juriy Kurilenko², Svetlana Kostenko^{2*}

¹Институт по развъждане и генетика на животните, НААН, ул. „Погребняка“, 1, Киевская област
Борисполский район, с. Чубинское, 08321

²Национален университет по биоресурси и природоползване на Украйна

¹Институт разведения и генетики животных НААН, ул. Погребняка, 1, Киевская область
Бориспольский район, с. Чубинское, 08321

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, ул. Генерала Родимцева, дом 11
корпус 7-а, НУБиП Украины, г. Киев, Украина, 03041

¹Institute of Animal Breeding and Genetics NAAS of Ukraine

²National University of the Environmental Science of Ukraine

***E-mail: swetakostenko@mail.ru**

Резюме**

Анализираны са темповете на соматичния мутагенезис в лимфоцити от периферна кръв при коне от породите Руски рисак, Холщайнер, Новоалександровски тежковоз, Украински ездови кон. Най-ниско ниво на анеуплоидия е установено при конете от Украинската ездова порода. При кобилите от Новоалександровската тежковозна порода са открити най-много асинхронни деления в центромерните райони на хромозомите. Най-малко количествени и структурни нарушения в генома на соматичните клетки има при Холщайнера. Установена е отрицателна корелация между броя на лимфоцитите с микроядра и млечната продуктивност при кобилите от породата Новоалександровски тежковоз.

Резюме

Проанализированы темпы соматического мутагенеза лимфоцитов периферической крови лошадей пород: русская рысистая, голштинская, новоалександровский тяжеловоз, украинская верховая. Для коней украинской верховой породы выявлен самый высокий уровень анеуплоидии. Кобылы новоалександровской тяжеловозной породы имеют самую высокую частоту асинхронного расщепления центромерных районов хромосом. Самый низкий уровень количественных и структурных нарушений геномов соматических клеток найден у лошадей голштинской породы. Найдена обратная связь между частотой лимфоцитов с микроядрами и молочной продуктивностью кобыл новоалександровской тяжеловозной породы.

Abstract

Analyzed the rate of somatic mutation of peripheral blood lymphocytes in horse breeds: Russian trotting, Holstein, novooleksandrovsky carthorse, Ukrainian horse. Ukrainian riding horses breed revealed the highest level of aneuploidy. Mares of novooleksandrovskoy carthorse breeds have the highest frequency of the asynchronous cleavage centromeric regions of chromosomes. The lowest level of quantitative and structural genomes abnormalities of somatic cells were found in Holsteins horses. Found an inverse relationship between the frequency of cells with micronuclei and milk productivity of mares Novoaleksandrovskaya carthorse breed.

Ключови думи: породи коне, хромозомни аберации, асинхронно делене на центромерните райони на хромозомите, микроядра, чернобълска „зона на отчуждаване“.

Ключевые слова: породы лошадей, хромосомные aberrации, асинхронное расщепление центромерных районов хромосом, микроядра, чернобыльская зона отчуждения.

Key words: horse breeds, chromosomal aberrations, asynchronous cleavage of centromeric regions of chromosomes, micronuclei, the Chernobyl exclusion zone.

ВВЕДЕНИЕ

Цитогенетический анализ широко используется для выявления животных-носителей конститутивных нарушений кариотипа (Kovaleva, 2008). Другим аспектом его применения является оценка уровня соматического мутагенеза. Дестабилизация генома соматических клеток, которая выходит за рамки уровня спонтанного мутагенеза, служит индикатором наличия мутагенного воздействия на животных. Генетический гомеостаз организма является неотъемлемым залогом его нормального роста, развития, функционирования и воспроизводства (Pikalova, 2007). У крупного рогатого скота найдена связь между уровнем соматического мутагенеза животных, их воспроизводительной способностью и продуктивными признаками (Dzitsyuk, 2009). В связи с одноплотностью цитогенетические нарушения лошадей могут негативно отражаться на их репродуктивной способности и таким образом общей экономической эффективности содержания (Ezzo et al., 2011).

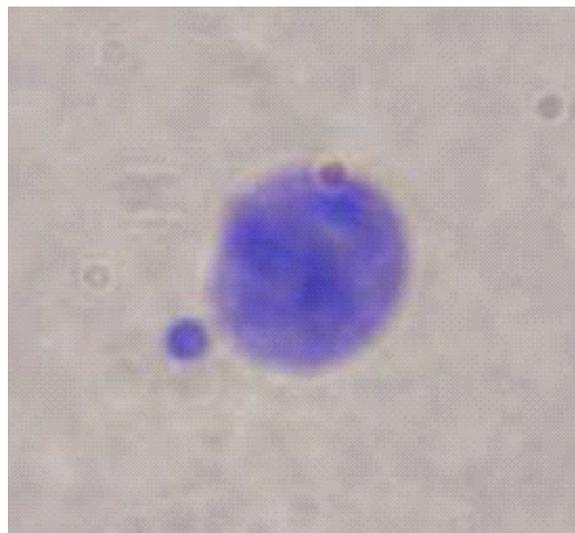
Среди всех видов сельскохозяйственных животных лошади являются наименее изученными по уровню спонтанной соматической изменчивости и спектру хромосомных нарушений в условиях действия мутагенных факторов (Atlas, 2000). К этому времени у лошадей недостаточно исследованной остается породоспецифичность цитогенетических показателей соматического мутагенеза. Поэтому целью нашей работы было изучение соматической изменчивости клеток крови лошадей разных пород.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовали цитогенетические препараты временных культур лимфоцитов периферической крови лошадей *in vitro*. Исследовали животных пород: русская рысистая, голштинская, украинская верховая (Киевский государственный ипподром) и лошадей, содержащихся для хозяйственных нужд в 30-км зоне отчуждения ЧАЭС (Лубянское лесничество «Чернобыльская пуца», пожарная часть Чернобыль, ЧЗО) и кобыл Новоалександровской тяжеловозной породы (Дибровский конный завод № 62, Полтавская обл.).

Цитогенетические препараты готовили из стабилизированной гепарином крови лошадей по стандартной методике (Shelyov and Dzitsyuk, 2005). При микроскопии определяли частоты лимфоцитов с микроядрами (МЯ, рис. 1), двуядерных (ДЯ, рис. 2) и количество делящихся клеток (митотический индекс, МИ, рис. 3). Подсчет осуществляли на 1000 клеток. У

каждого животного анализировали не менее 3000 клеток. При исследовании метафазных пластинок устанавливали процент клеток с хроматидными разрывами (ХР) и хромосомными фрагментами (ХФ), а также процент анеуплоидных (А) и полиплоидных (ПП) клеток, асинхронность расщепления центромерных районов хромосом (АРЦРХ). У каждого животного анализировали не менее 30 метафазных пластинок. Для исследования цитогенетических препаратов использовали бинокулярный микроскоп CarlZeiss. Анализ кариотипа осуществляли при увеличении микроскопа в 1000 раз.



Фиг. 1. Лимфоцит с микроядром

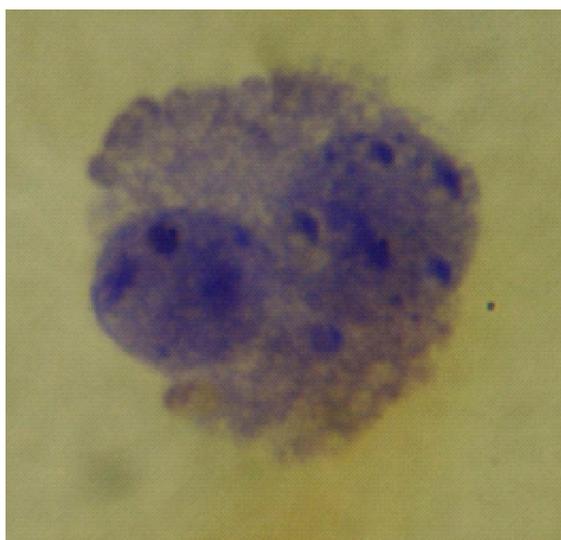
Рис. 1. Лимфоцит с микроядром (МЯ)

Fig. 1. Micronuclei lymphocyte

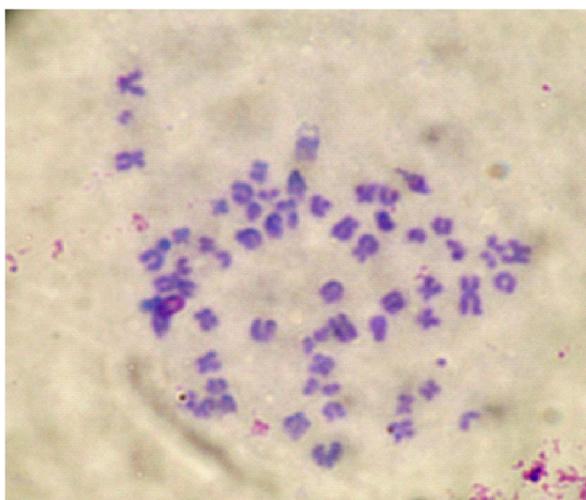
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе кариотипирования не были обнаружены животные-носители конститутивных цитогенетических нарушений. Результаты цитогенетического анализа временных лимфоцитов лошадей представлены на рис. 4.

Данные, представленные на рис. 4, свидетельствуют, что самое высокое количество клеток с микроядрами наблюдалась у лошадей в условиях ЧЗО на фоне хронического низкодозового ионизирующего облучения. Это подтверждает результаты исследований, полученные на животных других видов (*Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Microtus arvalis*) и свидетельствует,



Фиг. 2. Двоядрен лимфоцит
Рис. 2. Двоядерный лимфоцит (ДЯ)
Fig. 2. Binuclei lymphocyte



Фиг. 3. Метафазна пластинка (2n=64) с асинхронно делене на центромерния район на хромозомите
Рис. 3. Метафазная пластинка (2n= 64) с АРЦРХ
Fig. 3. Metaphase plate (2n=64) with ACCRC

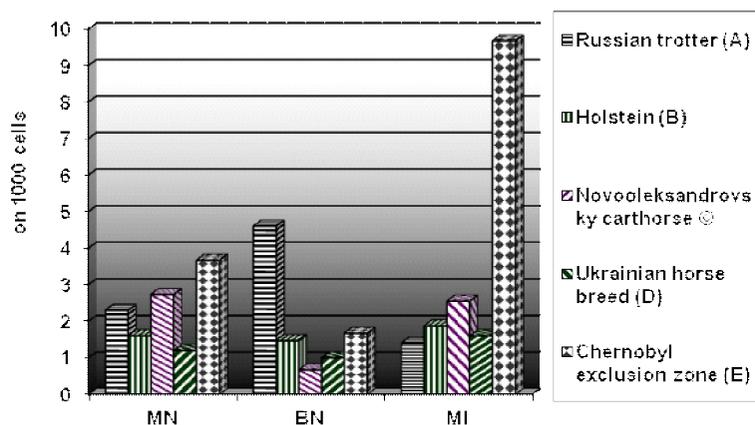
о том, что повышение частоты клеток с микроядрами является невидоспецифичной реакцией кариотипа на ионизирующее облучение. Следует отметить, что установлена зависимость между дозой облучения и количеством лимфоцитов с микроядрами (Rukavina et al., 2012). Heddle et al. считают, что микроядра могут образовываться за счет четырех основных механизмов: 1) потеря ацентричного фрагмента в процессе митоза, 2) как результат механических последствий хромосомных разрывов и обменов; 3) потеря целой хромосомы в процессе митоза; 4) как результат апоптоза (Heddle et al., 1991). На основе корреляционного

анализа в наших предыдущих исследованиях была обнаружена связь между частотой клеток с МЯ и анеупloidией ($r = 0,6$) у лошадей русской рысистой породы. У этих животных мы также наблюдали самую высокую среди исследованных лошадей частоту двоядерных лимфоцитов. У остальных животных количество двоядерных клеток находилось в пределах от 0,67 до 1,67‰. Повышение частоты ДЯ может быть следствием старения клеток *in vivo* и *in vitro* и природного замедления процессов цитокinesis (Kovaleva, 2008).

Сравнение МИ различных исследованных групп выявило повышенный уровень делящихся клеток, у животных, содержащихся в ЧЗО. Для них, как и для животных новоалександровской тяжеловозной породы было характерно значительное преобладание частоты МИ над ДЯ в отличие от лошадей русской рысистой породы. По данным, полученным на *M. arvalis*, *Microtus oeconomus*, с увеличением уровня загрязнения радионуклидами увеличивается размах индивидуальной изменчивости по МИ, частотой клеток с микроядрами и уменьшается количество двоядерных клеток (Andrushkevich et al., 1994). Известно, что животные, которые воспроизводятся на территориях с повышенным уровнем радионуклидного загрязнения, характеризуются более высокими темпами клеточного деления без задержки цитокinesis по сравнению с животными из более чистых регионов (Kostenko et al., 2001). Таким образом, проведенный нами цитогенетический анализ лошадей ЧЗО подтверждает предыдущие исследования других видов. Результаты анализа метафазных хромосом приведены на рис. 5.

Количественные изменения кариотипа в исследованных животных представлены анеупloidией и полипloidией, а структурные нарушения - хроматидными разрывами и хромосомными фрагментами. Процент анеупloidных метафаз был наивысшим у лошадей украинской верховой породы (6,3%). Полученные нами результаты подтверждают данные Дзицюк, которая также указывает на преобладание частоты анеупloidных клеток у лошадей украинской верховой породы (5,2%) по сравнению с тяжеловозными породами (1,2%) (Dzitsyuk, 2009). Анеупloidия чаще возникает как следствие нерасхождения хромосом в процессе митоза, в том числе и при воздействии радиоактивного облучения на нити веретена деления, что подтверждается результатами исследований и на других видах (Dzhus, 2012).

По полипloidии, несколько выше значение (2,62%) отмечено у лошадей Новоалександровской тяжеловозной породы по сравнению с украинской верховой. У лошадей голштинской и русской рысистой пород не обнаружили полипloidных клеток. Известно, что полипloidия возникает в результате выпадения стадии митоза из клеточного цикла или при слиянии двух



Статистически достоверные различия / Significant difference: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$;
 MN (лимфоциты с микроядрами / Micronuclei) - Между / between D / E **, B / E*, C / D ***, B / C *.
 EN (двуядерные лимфоциты / Binuclei) – Между / between C / E *, B / C *
 MI (митотический индекс / Mitotic index) – Между / between D / E *, C / D *.

Фиг. 4. Цитогенетични параметри на клетките от периферна кръв при конете

Рис. 4. Цитогенетические параметры клеток периферической крови лошадей

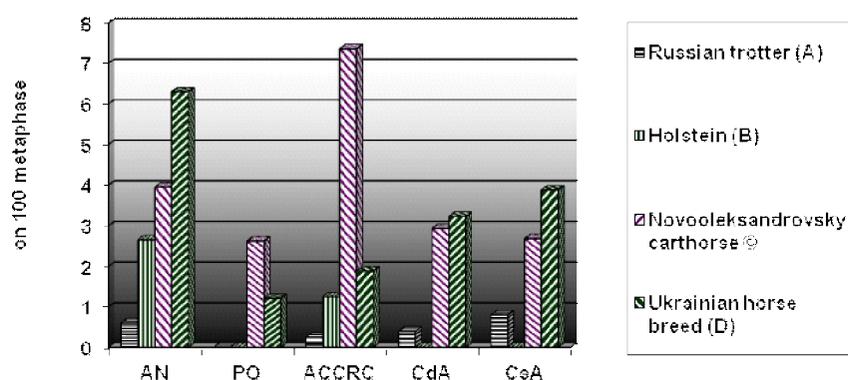
Fig. 4. The cytogenetic characteristic of horse peripheral blood cells

клеток (Kovaleva, 2008). По данным Джус уровнем полиплоидных клеток характеризуются именно лошади по сравнению с другими видами (Dzhus, 2012).

Известно, что APCPX возникает в результате преждевременной репликации прицентромерных гетерохроматиновых участков, ассоциированных с активностью центромеры (Kovaleva, 2008). У кобыл Новоалександровской тяжеловозной породы был обнаружен самый высокий уровень клеток с APCPX. Одним из объяснений этого явления может быть их

физиологическое состояние, обусловленное периодом лактации.

Наименьшее количество метафаз с хромосомными aberrациями обнаружено у лошадей русской рысистой породы. У Новоалександровской тяжеловозной и украинской верховой пород при цитогенетических исследованиях не были выявлены межпородные различия по частоте метафазных пластинок с хроматидными разрывами и хромосомными фрагментами. У лошадей голштинской породы вообще не наблюдалось структурных нарушений кариотипа.



Статистически достоверные различия / Significant difference: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$;

AN (Анеуплоидные / Aneuploidy) – Между / between A / D **, B / D *, A / C *;

PO (Полиплоидные / Polyploidy); CsA (Хромосомные aberrации / chromosomal aberration)

ACCRC (Асинхронные расщепления центромерных районов хромосом / Asynchronous cleavage of centromeric regions of chromosomes) – Между / between A / C, B, D ***;

CdA (Хроматидные aberrации / Chromatid aberration) – Между / between A / C, D *.

Фиг. 5. Хромозомен полиморфизъм на конете от изследваните групи

Рис. 5. Хромосомный полиморфизм лошадей исследованных групп

Fig. 5. The chromosomal instability of horse peripheral blood cells



ВЫВОДЫ

1. В результате цитогенетического исследования выявлены закономерности дестабилизации кариотипа лошадей, которые были обусловлены как наличием хронического низкодозового облучения так и породной принадлежностью.
2. Среди исследованных групп лошадей, животные, содержащиеся в условиях повышенного радиационного фона, характеризуются повышенной частотой лимфоцитов с микроядрами и показателем митотического индекса.
3. Высокий процент анеуплоидии, по сравнению со значением аналогичного показателя у других пород животных, характерен для лошадей украинской верховой породы.
4. Низкий уровень количественных и структурных нарушений генома соматических клеток отмечен у лошадей голштинской породы.
5. Высокий процент асинхронного расщепления центромерных районов хромосом обнаружен у кобыл Новоалександровской тяжеловозной породы.

LITERATURA

- Andrushkevich, G. S., E. G. Tyrsina, E. S. Kakpakova*, 1994. Radio-induced fusion and its possible role in cell population survival. Workshop on intercellular communication, P 54.
- Heddle, J. A., M. C. Cimino, M. Hayashi, F. Romagna, M. D. Shelby, J. D. Tucker, Ph. Vanparys, J. T. MacGregor*, 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. Environ. Mol. Mutagen, 18: 277-291.
- Ezzo, O. H., A. A. Farghaly, A. M. Abo El-Maaty, K. Gh. M. Mahmoud*, 2011. Hormonal and Cytogenetic Investigations in Mares with Early Embryonic Death. Global Veterinaria, 17, 3: 211-218.

- Rukavina, D., D. Hasanbašić, A. Sofradžija, A. Haverić, S. Haverić, A. Ajanović, Z. Gilić*, 2012. Učestalost hromosomskih aberacija i mikronukleusa u limfocitima konja nakon in vitro ozračenja niskim dozama ajonizirajućeg zračenja. Veterinaria, 61, 1-2: 51-62.
- Atlas veterinarnoy gematologii, 2000. V. Rigan, T. Sanders, D. Denikola. M.: Akvarium, 136 s.
- Dzhus, P. P.*, 2012. Vidospetsifichnist y destabilizatsii kariotipiv silysykogospodarsykih tvarin za radiatsynogo ta infektsynogo vplivu: avtoref. Dis. na zdobuttya nauk. stupenya kand. biol nauk: spets. 03.00.15 «Genetika», Kiiv, 20 s.
- Dzitsyuk, V. V.*, 2009. Hromosomniy polimorfizm okremih vidiv i porid silysykogospodarsykih tvarin: avtoref. Dis. na zdobuttya nauk. stupenya doktora s-g nauk: spets. 03.00.15 «Genetika», Chubinsyke, 30 s.
- Kovaleva, O. A.*, 2008. Tsitogeneticheskie anomalii v somaticheskikh kletkah mlekopitayushtih. Tsitologia i genetika. 1: 64-66.
- Kostenko, S. O., T. T. Glazko, E. G. Buntova*, 2001. Vidospetsifichnosty destabilizatsii kariotipa v usloviyah radionuklidnogo zagryaznenia (ChAES) u polevok *Microtus oeconomus*, *Microtus arvalis*, *Clethrionomys glareolus*. Tsitologia i genetika, T. 35, № 2: 11-18.
- Pikalova, L. V.*, 2007. Primenenie tsitogeneticheskikh metodov issledovania hromosom v radiologii. Molekulyarnaya biologiya, T. 9: 160-168.

**Преводът на български език е направен от проф. д-р Васил Николов.

Статията е приета на 12.12.2012 г.
Рецензент – проф. д-р Васил Николов
E-mail: vsn3480@abv.bg