

Цитогенетика сельскохозяйственных животных

УДК 636.2:575:576.38

**ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ
В КЛЕТКАХ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА РАЗНЫХ
НАПРАВЛЕНИЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ПРИ ДЕЙСТВИИ
НИЗКИХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Т.Т. ГЛАЗКО, С.Е. ДУБИЦКИЙ, Г.Ю. КОСОВСКИЙ

Анализировали частоты встречаемости ряда цитогенетических аномалий в клетках крови у молочного голштинизированного скота черно-пестрой породы, подвергавшегося низкодозовому ионизирующему облучению (менее 0,2 Гр/год), и животных мясной породы салерс. Наблюдавшиеся межгрупповые различия соответствуют повышенной нестабильности хромосомного аппарата у молочных пород по сравнению с животными двойного и мясного направлений продуктивности. Обсуждается сложность биоиндикации генотоксических воздействий с использованием подсчета цитогенетических аномалий у животных, отличающихся друг от друга по ряду морфофизиологических характеристик.

Ключевые слова: генотоксичность, цитогенетические аномалии, микроядерный тест, апоптоз, породы.

Для оценки генотоксичности какого-либо воздействия или степени загрязненности региона традиционно используют подсчет генных мутаций, хромосомных aberrаций и микроядерный тест (1). Однако накопленные данные наглядно свидетельствуют о широкой индивидуальной изменчивости как спонтанных частот встречаемости цитогенетических аномалий, так и их изменений в ответ на генотоксические воздействия. Например, у человека описана годовая и сезонная изменчивость частот встречаемости цитогенетических аномалий в клетках периферической крови (2). Обнаружено также, что клеточные популяции, полученные от одного донора, могут существенно отличаться друг от друга по чувствительности к ионизирующему облучению (3).

Стабильность хромосомного аппарата контролируется многими генами в дополнение к относительно небольшому числу тех, продукты которых участвуют в процессах репарации ДНК (4, 5). Проблема осложняется еще и тем, что доля мутантных клеток в соматических клеточных популяциях зависит не только от темпов их появления, но и от скорости элиминации. По-видимому, именно сложность этого признака лежит в основе индивидуальной изменчивости у групп млекопитающих в ответ на генотоксические воздействия одной и той же интенсивности, особенно в диапазоне низких доз.

Особую важность оценка дестабилизации генетического материала имеет при разведении сельскохозяйственных видов в связи с их очевидной экономической значимостью. В частности, обнаружено, что высокая частота встречаемости цитогенетических аномалий в клетках периферической крови статистически достоверно коррелирует с количеством аномальных сперматозоидов у крупного рогатого скота и, следовательно, может служить показателем вероятности снижения репродуктивной функции животных (6). Такие же взаимосвязи выявлены у человека (7).

Для того чтобы оценить индивидуальную изменчивость по частотам встречаемости различных цитогенетических аномалий у крупного рогатого скота, а также их возможную связь с генотоксическим эффектом низкодозового ионизирующего излучения, в настоящей работе выполнили

сравнительный анализ клеток периферической крови у коров двух пород при содержании в разных радиологических условиях.

Методика. Исследования проводили с использованием архива цитогенетических препаратов, созданного из краткосрочных культур периферической крови разных групп крупного рогатого скота. Анализировали образцы крови 6 коров 2-5-летнего возраста голштинизированной чернопестрой породы и 6 коров 2-4-летнего возраста породы салерс. Первая группа животных содержалась в хозяйстве «Куповатое» (30-километровая зона Чернобыльской АЭС), в котором уровень загрязненности почв ^{90}Sr и ^{137}Cs , по данным И.В. Чижевского (8), достигал соответственно $76,4 \pm 16,3$ и $266,1 \pm 70,3$ кБк/м², а поглощенная доза у животных в среднем не превышала 0,2 Гр/год, что соответствует низкодозовому диапазону для ионизирующего облучения (9). Животные второй группы содержались в условиях экспериментального хозяйства агроколледжа «Пушино» (Московская обл.).

Кровь брали из яремной вены животных, краткосрочную культуру клеток крови готовили на среде Хенкса 199 с добавлением антибиотиков (стрептомицин и пенициллин), фитогемагглютина и без добавления колхицина и колцемида. Клетки культивировали в течение 72 ч в термостате при температуре 37 °С, после чего суспензию центрифугировали (1000 об/мин, 10 мин) и инкубировали в гипотоническом растворе КС1 (0,54 %) в течение 50 мин. Затем проводили фиксацию смесью метилового спирта с уксусной кислотой (в соотношении 3:1) в следующей последовательности: фиксатор наслаивали на клеточную суспензию, освобожденную от гипотонического раствора, и 1,5 ч инкубировали клетки при температуре 4 °С, далее центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 мин, удаляли супернатант, повторно добавляли фиксатор, клетки суспендировали и центрифугировали в тех же условиях. Последнюю процедуру повторяли дважды. После последнего центрифугирования сливали супернатант, добавляли к клеткам свежий фиксатор и оставляли при 4 °С на сутки. Суспензию клеток наносили на чистые охлажденные предметные стекла. Для получения хороших препаратов метафазных хромосом некоторые стекла «отжигали», остальные высушивали на воздухе при комнатной температуре. После высушивания препараты обрабатывали красителем Гимза («Merck», Германия).

Оценивали частоты встречаемости метафаз с ассоциациями хромосом по центромерным районам по типу робертсоновских транслокаций (РБ), хромосомными aberrациями (ХА) (хромосомные, хроматидные разрывы; кольцевые хромосомы, фрагменты), асинхронным расщеплением центромерных районов хромосом (АРЦХ), а также долю полиплоидных (ПП) и анеуплоидных клеток типов АI и АII. При учете анеуплоидии I типа (АI) определяли долю клеток с числом хромосом от 53 до 63 ($2n \pm < 10$). Очевидно, что в изменчивость этой характеристики существенный вклад могут вносить особенности гипотонической обработки клеток и изменчивость стабильности их плазматических мембран. Ко второму типу анеуплоидии (АII) относили метафазы, в которых число хромосом было 59 или 61 (то есть $2n \pm 1$). Предположительно этот тип анеуплоидии с относительно большей вероятностью может быть связан с нарушениями расхождения хромосом в митозе, чем АI. Число двоядерных лимфоцитов (ДЯ) и одноядерных лимфоцитов с микроядрами (МЯ) подсчитывали на тех же препаратах в клетках с сохранившейся цитоплазмой. Количество митозов (митотический индекс МИ), частоты встречаемости ДЯ и МЯ рассчитывали в 3000 клеток и выражали в промилле (число на 1000 кле-

ток, ‰). Для исследований препаратов метафазных пластинок использовали бинокулярный микроскоп фирмы «Carl Zeiss» Jena (Германия) при увеличении $\times 1000$. Статистическую достоверность межгрупповых различий оценивали по критерию Стьюдента (t_S).

Результаты. При подсчете частоты встречаемости в клетках периферической крови метафазных пластинок с различными типами цитогенетических аномалий — хромосомными aberrациями (ХА), полиплоидией (ПП), анеуплоидией (типов АI и АII), с межхромосомными слияниями по перицентромерным районам по типу робертсоновских транслокаций (РБ), а также с асинхронностью расщепления центромерных районов хромосом в конце метафазы (АРЦХ) (табл. 1) оказалось, что у животных черно-пестрой породы статистически достоверно выше ($P < 0,05$) были частоты встречаемости анеуплоидных клеток (АI и АII). По остальным показателям разница была статистически недостоверной, хотя наблюдалась определенная тенденция к повышению частот встречаемости метафаз с ХА, ПП, АРЦХ.

1. Частоты встречаемости (%) метафазных пластинок с цитогенетическими аномалиями в клетках периферической крови у коров разных пород, содержащихся в условиях низкодозового ионизирующего излучения (хозяйство «Куповатое») и в относительно «чистой» зоне (хозяйство агроколледжа «Пушино», Московская обл.)

Число метафаз	АI	АII	ПП	Частота встречаемости метафаз		
				РБ	ХА	АРЦХ
Голштинизированная черно-пестрая порода						
($n = 4$, хозяйство «Куповатое», зона Чернобыльской АЭС)						
370	61±5*	15±3*	9±2	7±2	4±1	9±3
Порода салерс						
($n = 6$, хозяйство агроколледжа «Пушино», Московская обл.)						
333	37±4*	2±1*	5±1	11±2	2±1	6±1

Примечание. АI ($2n \pm < 10$) и АII ($2n \pm 1$) — анеуплоиды, ПП — полиплоиды, РБ — метафазы с межхромосомными ассоциациями по типу робертсоновских транслокаций, ХА — хромосомные aberrации, АРЦХ — асинхронность расщепления центромерных районов хромосом.
* $P < 0,05$.

Частоты ХА были близкими к наблюдавшимся у крупного рогатого скота при содержании в условиях индустриального загрязнения (10). Следует отметить также, что высказываются предположения о тесной связи АРЦХ с механизмами формирования анеуплоидных клеток (11, 12).

В этих же препаратах оценили частоты встречаемости двуядерных (ДЯ), одноядерных клеток с микроядрами (МЯ), митозов (МИ) и апоптозов (табл. 2) и обнаружили, что у животных голштинизированной черно-пестрой породы частота МЯ статистически достоверно ($P < 0,01$) выше, а доля апоптозных клеток — ниже ($P < 0,05$), чем у коров породы салерс.

Повышенная частота встречаемости МЯ (см. табл. 2) в клетках периферической крови коров черно-пестрой породы хорошо согласуется с обнаруженной у них же повышенной частотой анеуплоидов и тенденцией к относительно большей частоте метафаз с ХА (см. табл. 2), которые являются источниками формирования клеток с микроядрами (7).

Можно было бы считать полученные данные свидетельством того, что относительно повышенная частота встречаемости цитогенетических аномалий в клетках периферической крови у скота черно-пестрой породы является следствием действия низкодозового ионизирующего облучения животных в условиях хозяйства «Куповатое», расположенного на границе зоны отчуждения Чернобыльской АЭС. В то же время ранее мы получили данные о межпородных различиях по ряду характеристик нестабильности хромосомного аппарата у черно-пестрых голштинов, симменталов и жи-

вотных украинской мясной породы (13). Специализированный молочный скот, как правило, отличался от животных мясного и двойного направлений продуктивности повышенными анеуплоидией и числом клеток с микроядрами. Таким различиям соответствуют результаты сравнения групп голштинизированного скота черно-пестрой породы и салерсов, поскольку первая порода — молочного, вторая — мясного направления продуктивности.

2. Частота встречаемости (%) клеток на разных стадиях клеточного цикла в периферической крови крупного рогатого скота разного направления продуктивности при содержании в условиях низкодозового ионизирующего излучения

№ животного	ДЯ	МИ	МЯ	Апоптоз
Порода салерс (хозяйство агроколледжа «Пушино», Московская обл.)				
1	6,3	13,6	4,3	10,6
2	5,3	8,0	3,3	4,4
3	5,7	6,7	3,7	3,3
4	6,0	7,0	4,0	4,0
5	5,7	7,7	3,0	3,0
6	5,7	11,0	4,0	1,2
Среднее	5,8±0,1	9,0±1,1	3,7±0,3**	4,4±1,3*
Голштинизированная черно-пестрая порода (хозяйство «Куповатое», зона Чернобыльской АЭС)				
1	5,0	4,0	4,7	0,3
2	6,7	8,7	7,7	0,3
3	7,7	3,3	7,3	1,0
4	9,7	8,7	7,0	2,0
5	7,0	10,6	6,3	1,3
6	5,0	9,3	6,0	1,0
Среднее	6,9±0,6	7,4±1,2	6,5±0,4**	1,0±0,3*

Примечание. МИ — митоз, ДЯ — двуядерные клетки, МЯ — одноядерные клетки с микроядрами.
* P < 0,05; ** P < 0,01.

Так, количественные характеристики нестабильности хромосомного аппарата клеток крови молочного скота из хозяйства «Куповатое» находятся в пределах значений, выявленных у животных молочных пород из сравнительно экологически благополучных районов (например, частота лимфоцитов с микроядрами — 5-7 %) (13), но достоверно отличаются от показателей, типичных для мясных пород.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что при определении генотоксических эффектов ионизирующего излучения в низкодозовом диапазоне полученные оценки могут быть завышены, если не учитывать, в частности, физиологические различия между группами животных одного и того же вида, пола и возраста. По-видимому, именно трудности контроля таких различий приводят к неоднозначности результатов биоиндикации генотоксических воздействий на основе частот цитогенетических аномалий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды АМН СССР. М., 1989.
2. Anderson D.A., Francis A.J., Godbert P. e.a. Chromosome aberrations (CA), sister-chromatid (SCE) and mutagen-induced blastogenesis in cultured peripheral lymphocytes from 48 control individuals sampled 8 times over 2 years. Mut. Res., 1991, 250: 467-476.
3. Amundson S.A., Fen Xia, Wolfson K. e.a. Different cytotoxic and mutagenic responses induced by x-rays in two human lymphoblastoid cell lines derived from a single donor. Mut. Res., 1993, 286: 233-241.
4. Marnett L.J., Plastaras J.P. Endogenous DNA damage and mutation. Trends Genet., 2001, 17(4): 214-221.
5. Samper E., Nicholls D.G., Melov S. Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts. Aging Cell, 2003, 2: 277-285.
6. Rubes J., Horinova Z., Gustavson I. e.a. Somatic chromosome mutations and morphological abnormalities in sperms of boars. Hereditas, 1991, 115: 139-143.
7. Migliore L., Colonnato R., Naccarati A. e.a. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study. Mutagenesis,

- 2006, 21(2): 149-152
8. Ч и ж е в с ь к и й І.В. Оцінка параметрів переходу ^{90}Sr і ^{137}Cs до організму та продукції великої рогатої худоби при пасовищному утриманні тварин (на прикладі зони відчуження Чорнобильської АЕС). Автореф. канд. дис. Київ, 2004.
 9. Б у р л а к о в а Е.Б., Г о л о щ а п о в А.Н., Г о р б у н о в а Н.В. и др. Особенности биологического действия «малых» доз облучения. Рад. биол. и радиоэкол., 1996, 36(4): 610-631.
 10. P a g a d a R., J a s z c z a k K. A cytogenetic study of cows from a highly industrial or an agricultural region. Mut. Res., 1993, 300(3-4): 259-263.
 11. V i g В.К. Sequence of centromere separation: occurrence, possible significance and control. Cancer Genet. Cytogenet., 1983, 8(3): 249-274.
 12. А к о п я н Г.Р. Центромерна нестабільність та поліморфізм хромосом в нормі і при патології людини. Автореф. докт. дис, Київ, 2006.
 13. Г л а з к о Т.Т., С а ф о н о в а Н.А. Між- и внутріпородна цитогенетична нестабільність у великій рогатій худобі. Зб. наук. пр. інституту агроєкології та бітехнології УААН. Київ, 2000, 4: 198-209.

ФГОУ ВПО Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева,
127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: vglazko@yahoo.com;
ФМБА России, Клиническая больница № 6
им. А.И. Бурназяна,
123098 г. Москва, ул. Маршала Новикова, 23

Поступила в редакцию
30 августа 2007 года

FREQUENCY OF OCCURRENCE OF CYTOGENETIC ANOMALIES IN BLOOD CELLS OF CATTLE OF DIFFERENT PRODUCTIVITY LINES UNDER ACTION OF LOW DOSES OF IONIZING RADIATION

T.T. Glazko, S.E. Dubitskii, G.Yu. Kosovskii

S u m m a r y

The authors analyzed the frequencies of occurrence of some cytogenetic anomalies in blood cells in milk holsteinizing cattle of the Black-and-White breed after low doses of ionizing radiation (less 0.2 Gr/year) and the meat cattle of the Sealers breed. Identified batch-to-batch variation corresponds to raised instability of chromosomal apparatus in milk breeds as compared with cattle of double or meat productivity lines. The complexity of bioindication of genotoxic effect by means of calculation of cytogenetic anomalies in animals different one from another by same morphophysiological characteristics is discussed.

Новые книги

С е м е н о в А.С. **Цитогенетический мониторинг голштинизированного чернопестрого скота разных регионов.** Пермь: изд-во ФГОУ ВПО «Пермская ГСХА», 2007, 161 с.

В монографии рассматриваются вопросы использования цитогенетических методов в селекции крупного рогатого скота. Приведены результаты исследований кариотипической изменчивости и качественного состояния эритроцитов у коров с различным уровнем молочной продуктивности и воспроизводительных качеств. Обоснована необходимость и практическая значимость контроля генетической полноценности племенных животных, обсуждается возможность прогнозирования со-

стояния их здоровья и продуктивности. Представлен ретроспективный анализ молочной продуктивности коров в зависимости от происхождения по линии отцов.

В е р е щ а г и н а В.А. **Основы общей цитологии.** Уч. пос. Изд. 2-е, перераб. М.: издательский центр «Академия», 176 с.

В учебном пособии охарактеризованы структурно-функциональные особенности клеток на основе данных световой, электронной микроскопии и других методов исследования с привлечением сведений из биохимии и молекулярной биологии. Освещены основные закономерности строения и функций, общие для клеток вне зависимости от их органного, тканевого или видового происхождения.