

## ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ МОНІТОРИНГ СОМАТИЧНОГО МУТАГЕНЕЗУ КОНЕЙ

*С.О. Костенко, кандидат біологічних наук*

*Ю.Ф. Куриленко, аспірант\**

*Національний університет біоресурсів  
і природокористування України*

*П.П. Джус, Л.Ф. Стародуб, кандидати сільськогосподарських наук  
Інститут розведення і генетики тварин НААН України\**

*Проаналізовано цитогенетичні культури лімфоцитів периферійної крові коней порід: російська рисиста, голштинська, новоолександрівський ваговоз, українська верхова, що утримуються в радіоактивно благополучних районах та тварин, що знаходяться у чорнобильській зоні відчуження. Відмічено підвищення частоти клітин з мікроядрами в умовах чорнобильської зони відчуження. Найвищий відсоток анеуплоїдії характерний для коней української верхової породи. Кобили новоолександрівської ваговозної породи мають найвищий відсоток асинхронного розщеплення центромірних районів хромосом. Найнижчий рівень кількісних і структурних порушень геному соматичних клітин порівняно із тваринами інших досліджених порід знайдено у коней голштинської породи.*

***Кінь свійський, порода, російська рисиста, голштинська, новоолександрівський ваговоз, українська верхова порода, мітотичний індекс, хромосомні аберації, асинхронне розщеплення центромірних районів хромосом, мікроядра.***

Цитогенетичний аналіз широко використовують для виявлення тварин-носіїв конститутивних порушень каріотипу [7]. Іншим аспектом його застосування є оцінка рівня соматичного мутагенезу. Дестабілізація геному соматичних клітин, що виходить за межами рівня спонтанного мутагенезу, є індикатором наявності мутагенного впливу чинників різної природи на тварин. Генетичний гомеостаз організму є невід'ємною запорукою його нормального росту, розвитку, функціонування і відтворення [9]. У великої рогатої худоби знайдено зв'язок між рівнем соматичного мутагенезу тварин, їх відтворною здатністю та продуктивними ознаками [6]. У зв'язку з моноплідністю цитогенетичні порушення у коней можуть негативно впливати на їх репродуктивні здатності і отже загальну економічну ефективність утримання [3].

Серед усіх видів сільськогосподарських тварин коні є найменш вивченими за рівнем спонтанної соматичної мінливості та спектром хромосомних порушень в умовах дії мутагенних чинників [10]. До тепер у коней

---

\*Науковий керівник – кандидат біологічних наук, С.О. Костенко

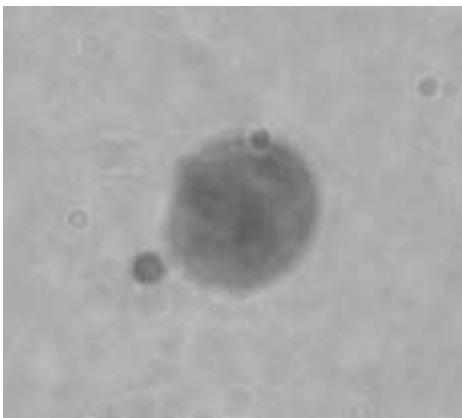
© С.О. Костенко, Ю.Ф. Куриленко, П.П. Джус, Л.Ф. Стародуб, 2012

недостатньо дослідженою залишається породоспецифічність цитогенетичних показників соматичного мутагенезу.

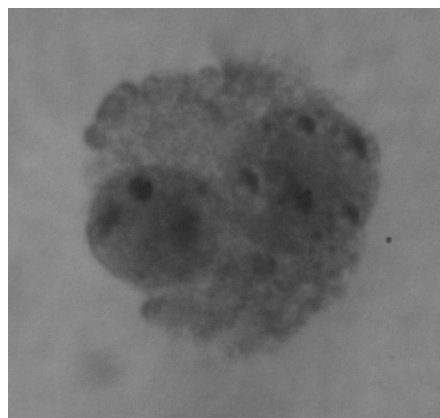
**Мета дослідження** – вивчення соматичної мінливості клітин крові коней різних порід.

**Матеріали і методи дослідження.** Аналіз проводили за використання цитогенетичних препаратів тимчасових культур лімфоцитів периферичної крові коней *in vitro*. Досліджували тварин порід: російська рисиста, голштинська, українська верхова (Київський державний іподром) та коней, яких утримують для господарських потреб у 30-кілометровій зоні відчуження ЧАЕС (Луб'янське лісництво «Чорнобильська пуща», пожежна частина м.Чорнобиль, ЧЗВ) та кобил новоолександрівської ваговозної породи (Дібрівський кінний завод № 62, Полтавська обл.).

Цитогенетичні препарати готували із стабілізованої гепарином крові коней за стандартною методикою [11]. При мікроскопії визначали частоти лімфоцитів із мікроядрами (МЯ, рис. 1), двоядерних (ДЯ, рис. 2) та кількість клітин, що діляться (мітотичний індекс, МІ, рис. 3). Підрахунок здійснювали на 1000 клітин. Від кожної тварини аналізували не менше 3000 клітин. При дослідженні метафазних пластинок встановлювали відсоток хроматидних розривів (ХР) та хромосомних фрагментів (ХФ), а також відсоток анеуплоїдних (А) і поліплоїдних (ПП) клітин, асинхронність розщеплення центромерних районів хромосом (АРЦРХ). У кожній тварини аналізували не менше 30 метафазних пластинок. Для дослідження цитогенетичних препаратів використовували бінокулярний мікроскоп Carl Zeiss. Аналіз каріотипу здійснювали при збільшенні мікроскопа у 1000 разів.



**Рис. 1.** Лімфоцит із мікроядром (МЯ)



**Рис. 2.** Двоядерний лімфоцит (ДЯ)

**Результати дослідження та їх обговорення.** У ході каріотипування не були виявлені тварини-носії конститутивних цитогенетичних порушень. Результати цитогенетичного аналізу тимчасових лімфоцитів коней наведено в табл. 1.

Дані, наведені в табл. 1, свідчать, що найвища кількість клітин з мікроядрами спостерігалася у коней в умовах ЧЗВ на фоні хронічного низькодозового іонізуючого опромінення. Це підтверджує результати досліджень, що отримані на тваринах інших видів (*Sus scrofa*, *Bos taurus*,

*Microtus arvalis*) і свідчить, що підвищення частоти клітин з мікроядрами є невидоспецифічною реакцією каріотипу на іонізуюче опромінення. Слід відмітити, що встановлена залежність між дозою опромінення і кількістю лімфоцитів з мікроядрами [4]. Heddle et al. вважають, що мікроядра можуть утворюватися завдяки чотирьом основним механізмам: 1) втрата ацентричного фрагмента у ході мітозу; 2) як результат механічних наслідків хромосомних розривів і обмінів; 3) втрата цілої хромосоми у ході мітозу; 4) як результат апоптозу [2]. На підставі кореляційного аналізу в наших попередніх дослідженнях було виявлено у коней зв'язок між частотою клітин з МЯ та анеуплоїдією ( $r=0,6$ ) у коней російської рисистої породи. У цих тварин ми також спостерігали найвищу серед досліджених частоту двоядерних лімфоцитів. У решти тварин кількість двоядерних клітин знаходилась у межах від 0,67 до 1,67 %. Підвищення частоти ДЯ може бути наслідком старіння клітин *in vivo* і *in vitro* і природного сповільнення процесів цитокінезу [7].

### 1. Цитогенетичні параметри клітин периферійної крові коней

№	Порода	n	На 1000 клітин, ‰		
			МЯ	ДЯ	МІ
1.	Російська рисиста	8	2,3±1,3	4,6±3	1,4
2.	Голштинська	5	1,67±0,38	1,47±0,31	1,87±0,13
3.	Новоолександрівський ваговоз	11	2,73±0,25	0,67±0,08	2,55±0,34
4.	Українська верхова	5	1,2±0,25	1,0±0,21	1,6±0,19
5.	Коні ЧЗВ	6	3,67 ± 0,69	1,67 ± 0,38	9,67 ± 3,67

Статистично вірогідні різниці: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$

МЯ – між 4 і 5\*\*; 5 і 2\*; 3 і 4\*\*\*; 2 і 3\*

ДЯ – між 3 і 5\*; 2 і 3\*. МІ – між 4 і 5\*; 3 і 4\*

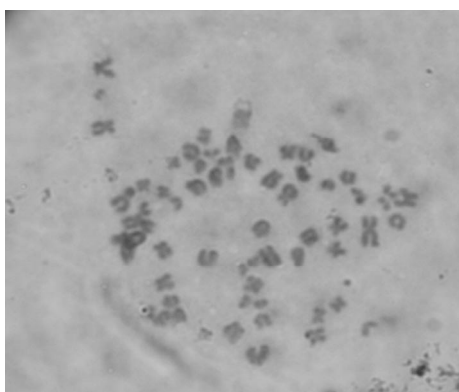


Рис. 3. Метафазна пластинка  $2n=64$

Порівняння МІ різних досліджених груп виявило підвищений рівень клітин, що діляться у тварин, що утримуються в ЧЗВ. Для них, як і для тварин новоолександрівської ваговозної було характерне значне переважання частоти МІ над ДЯ на відміну від коней російської рисистої породи. За даними, отриманими на *M. arvalis*, *Microtus oeconomus*, із збільшенням

рівня забруднення радіонуклідами збільшується розмах індивідуальної мінливості за MI, частотою клітин із мікроядрами і зменшується кількість двоядерних клітин [1]. Відомо, що тварини, які відтворюються на територіях з підвищеним радіонуклідним забрудненням, характеризуються більш високими темпами клітинного поділу без затримки цитокінезу, порівняно з тваринами із більш чистих регіонів [8]. Отже, проведений нами цитогенетичний аналіз коней ЧЗВ підтверджує попередні дослідження інших видів. Результати аналізу метафазних хромосом наведено в табл. 2.

## 2. Хромосомний поліморфізм коней досліджених груп

№	Порода	На 100 метафаз, %				
		A	ПП	АРЦРХ	ХР	ХФ
1.	Російська рисиста	0,6±1,4	0	0,25±0,6	0,4±0,5	0,8±0,9
2.	Голштинська	2,65±1,25	0	1,25±0,77	0	0
3.	Новоолександрівський ваговоз	3,95±0,73	2,62±0,74	7,36±1,11	2,93±0,82	2,68±0,86
4.	Українська верхова	6,3±0,96	1,21±0,74	1,88±0,77	3,23±1,02	3,88±1,21

Вірогідність різниці: \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

A – між 1 і 4\*\*; 2 і 4\*; а і с\*; АРЦРХ – між 1 і 3,b,d\*\*\*; ХР – між 1 і 3\*; 1 і 4\*

Кількісні зміни каріотипу у досліджених тварин подано анеуплоїдією та поліплоїдією, а структурні порушення – хроматидними розривами і хромосомними фрагментами. Відсоток анеуплоїдних метафаз був найвищим у коней української верхової породи (6,3 %). Одержані нами результати підтверджують дані В.В. Дзіцюк, яка також свідчить про переважання кількості анеуплоїдних клітин у коней української верхової породи (5,2 %) порівняно із ваговозними породами (1,2 %) [6]. Анеуплоїдія частіше виникає як наслідок нерозходження хромосом у ході мітозу, в тому числі і при дії радіоактивного опромінення на нитки веретена поділу, що підтверджується результатами досліджень і на інших видах [5].

Щодо поліплоїдії, дещо вищі значення (2,62 %) відмічено у коней породи новоолександрівський ваговоз порівняно із українською верховою. У коней голштинської породи і російської рисистої взагалі не виявлено поліплоїдних клітин. Відомо, що поліплоїдія виникає внаслідок випадіння стадії мітозу із клітинного циклу або при злитті двох клітин [7]. За даними П.П. Джус, найвищим рівнем поліплоїдних клітин характеризуються саме коні порівняно з іншими видами [5].

Відомо, що АРЦРХ виникає внаслідок передчасної реплікації перичентромерних гетерохроматинових ділянок, асоційованих з активністю центромери [7]. Нами найвищий рівень клітин з АРЦРХ виявлений у кобил новоолександрівської ваговозної породи. Одним з пояснень цього явища може бути їх фізіологічний стан, обумовлений періодом лактації.

Найменша кількість метафаз з хромосомними абераціями виявлена у коней російської рисистої породи. У новоолександрівської та української верхової порід при цитогенетичних дослідженнях не було виявлено міжпородних відмінностей за частотою хроматидних розривів і хромосом-

них фрагментів. У коней голштинської породи взагалі не спостерігалось структурних порушень каріотипу.

### Висновки

1. Внаслідок цитогенетичного дослідження виявлені закономірності дестабілізації каріотипу коней, які були обумовлені як наявністю хронічного низькодозового опромінення, так і породною належністю.

2. Серед досліджених груп коні, що утримуються в умовах підвищеного радіаційного фону характеризуються найвищою частотою лімфоцитів з мікроядрами та показником мітотичного індексу.

3. Найвищий відсоток анеуплоїдії порівняно із значенням аналогічного показника у інших порід тварин характерний для коней української верхової породи.

4. Найнижчий рівень кількісних і структурних порушень геному соматичних клітин відмічено у коней породи голштин.

5. Найвищий відсоток асинхронного розщеплення центромірних районів хромосом виявили у кобил новоолександрівської ваговозної породи.

### Список літератури

1. Andrushkevich G. S. Radio-induced fusion and its possible role in cell population survival /G.S. Andrushkevich, E.G.Tyrkina, E. S. Kakpakova // Workshop on intercellular communication. – 1994. – P. 54.

2. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future / J.A. Heddle, M.C. Cimino, M. Hayashi, F. Romagna [et al.] // Environ. Mol. Mutagen. – 1991. – 18. – P. 277–291.

3. Hormonal and Cytogenetic Investigations in Mares with Early Embryonic Death / H. Omaira Ezzo, A.A. Farghaly [et al.] // Global Veterinaria. – 2011. – № 7 (3). – P. 211–218.

4. Učestalost hromosomskih aberacija i mikronukleusa u limfocitima konja nakon in vitro ozračenja niskim dozama jonizirajućeg zračenja / Rukavina Dunja, Hasanbašić Danica [et al.] // Veterinaria. – 2012. – № 61 (1–2). – P. 51–62.

5. Джус П.П. Видоспецифічність дестабілізації каріотипів сільськогосподарських тварин за радіаційного та інфекційного впливу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол наук: спец. 03.00.15 «Генетика»/ П.П. Джус. – К., 2012. – 20 с.

6. Дзіцюк В.В. Хромосомний поліморфізм окремих видів і порід сільськогосподарських тварин: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора с.-г. наук: спец. 03.00.15 «Генетика»/ В.В. Дзіцюк. – Чубинське, 2009. – 30 с.

7. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих. / О.А. Ковалева //Цитология и генетика. – 2008. –№ 1. – С. 64–66.

8. Костенко С.О. Видоспецифичность дестабилизации кариотипа в условиях радионуклидного загрязнения (ЧАЭС) у полевок *Microtus oeconomus*, *Microtus arvalis*, *Clethrionomys glareolus* / С.О. Костенко, Т.Т. Глазко, Є.Г. Бунтова // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 2. – С. 11–18.

9. Пикалова Л.В. Применение цитогенетических методов исследования хромосом в радиологии / Л.В. Пикалова // Молекулярная биология. – 2007. – Т. 9. – С. 160–168.

10. Риган В. Атлас ветеринарной гематологии / Риган В., Сандерс Т., Деникола Д. – М.: Аквариум, 2000. – 136 с.

11. 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. – 2005. – С. 210–213.

*Проанализированы цитогенетические культуры лимфоцитов периферической крови лошадей пород: русская рысистая, голштинская, новоолександровский тяжеловоз, украинская верховая, которые содержатся в радиоактивно благополучных районах и животных, которые находятся в чернобыльской зоне отчуждения. Отмечено повышение частоты клеток с микроядрами в условиях Чернобыльской зоны отчуждения. Самый высокий уровень анеуплоидии характерен для коней украинской верховой породы. Кобылы новоолександровской 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.*

***Лошадь домашняя, русская рысистая порода, голштинская, новоолександровский тяжеловоз, украинская верховая порода, митотический индекс, хромосомные aberrации, асинхронное расщепление центромерных районов хромосом, микроядра.***

*Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocyte cultures horse breeds: Russian trotting, Holstein, Novooleksandrivska carthorse, Ukrainian horse contained in radiation deprived areas and the animals from Chornobyl exclusion zone. Found increased frequency of cells with micronuclei in Chornobyl exclusion zone. The highest level of aneuploidy characteristic of Ukrainian ride horse breed horses. Mares Novooleksandrovaska breeds have the highest frequency of the chromosomes asynchronous cleavage centromeric regions. The lowest level of quantitative and structural violations genomes of somatic cells found in horses Holsteins.*

***Horse, Russian trotter, Holstein, Novooleksandrsvska carthorse, Ukrainian ride horse breed, mitotic index, chromosomal aberrations, chromosomes asynchronous cleavage of centromeric regions, micronuclei.***