

УДК 636.2:
[576.316^575.224.4]
© 2018

УЧАСТЬ ІНДИВІДУАЛЬНИХ ХРОМОСОМ У КОНСТИТУТИВНИХ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ АНОМАЛІЯХ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

В.В. Дзіцюк¹, О.Є. Гузеватий²

¹ доктор сільськогосподарських наук

² кандидат біологічних наук

¹ Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН
вул. Погребняка, 1, Чубинське Бориспільського р-ну Київської обл., 08321, Україна

² Національна академія аграрних наук України
вул. Михайла Омеляновича-Павленка, 9, м. Київ, 01010, Україна
e-mail: ¹valentynadzitsiuk@gmail.com, ²oleg_guzevatij@ukr.net

Надійшла 20.02.2018

Мета. Дослідження участі індивідуальних хромосом у конститутивних цитогенетичних аномаліях великої рогатої худоби. **Методи.** Культивування лімфоцитів, приготування цитогенетичних препаратів. Класифікацію та облік аберацій хромосом здійснювали за загальноприйнятими методиками. **Результати.** Досліджено частоту участі окремих хромосом у хромосомних перебудовах. Установлено, що найчастіше трапляються розриви хромосом: 1-ї (20%), 2- (16), 13- (8,5) і 21-ї (7%). За результатами аналізу диференційно пофарбованих препаратів хромосом установили, що розриви відбуваються в місцях між еу- і гетерохроматиновими сегментами хромосом. **Висновки.** Одержані експериментальні дані свідчать, що частота участі індивідуальних хромосом у конститутивних цитогенетичних аномаліях може бути використана як один з показників неспецифічної дестабілізації хромосомного апарату тварин.

Ключові слова: велика рогата худоба, каріотип, цитогенетичний аналіз, лімфоцити, аберації хромосом.

Ще у 70–80-х роках минулого століття почали бурхливо розвиватися цитогенетичні дослідження сільськогосподарських тварин [1, 2].

Нині в провідних економічно розвинених країнах світу існують програми цитогенетичного обстеження ссавців, а для племінних господарств цитогенетичний моніторинг є обов'язковим.

Однак незважаючи на достатньо давно встановлену необхідність цитогенетичного контролю сільськогосподарських тварин, у першу чергу, великої рогатої худоби, в Україні дослідження їх хромосомного апарату проводиться в обмеженій кількості.

Одним із важливих завдань цитогенетики сільськогосподарських тварин є визначення характеру аномалій каріотипу, встановлення можливих шляхів їх виникнення та їхній

вплив на функціонування систем організму. Незважаючи на еволюційно відпрацьований механізм, що зберігає сталу фізико-хімічну і морфологічну організацію хромосом ссавців, під впливом різних чинників ця організація може змінюватися. В основі змін структури хромосом, як правило, лежать первинні порушення її цілісності — розриви, які супроводжуються різними перебудовами і які, в свою чергу, спричиняють зміну локалізації генів. Дані процеси призводять до зміни характеру функціонування генів, що супроводжується зміною генетичної програми. Очевидно, що у структурні аберації, виходячи із різноманітності варіантів описаних хромосомних аберацій, може залучатися будь-яка хромосома каріотипу. Підтвердженням цьому є загальноновизнана у 80-х роках

минулого століття гіпотеза Nadeau-Taylor, згідно з якою хромосомні мутації можуть виникати у різних хромосомах випадковим чином [3]. Гіпотеза базувалася на результатах аналізу розподілу довжин гомологічних синтенних блоків (*homologous syntenic blocks*), тобто районів хромосом різних видів ссавців, що містять ортологічні гени в однаковій послідовності. Деякі автори також виявили, що розриви хромосом та їхнє возз'єднання виникають випадково за довжиною хромосоми, а їх частота залежить від кількості ДНК у даній хромосомі [4]. Однак аналіз інших літературних джерел дає підставу вважати, що існує нерівномірність розподілу індивідуальних хромосом у хромосомних абераціях [5]. Окремі хромосоми найбільш схильні до розривів і утворення транслокацій і можна очікувати на певну специфічність участі окремих хромосом у хромосомних абераціях тварин [6]. Результати досліджень Morad M., Jonasson J. також підтверджують не випадковість появи розривів у хромосомах і переважну локалізацію їх в ділянках структурного гетерохроматину або на межі між гетерохроматиновим і еухроматиновим матеріалом [7].

Питання наскільки випадковими є місця хромосомних розривів, окрім теоретичного, має і практичне значення. Відомо, що еухроматинові і гетерохроматинові ділянки хромосом відрізняються за молекулярною і генетичною організацією ДНК. Якщо стосовно еухроматинових ділянок все досить очевидно — в них міститься основна частина генів, необхідних для розвитку організму і функціонування клітин, то питання про функціональну значимість гетерохроматину дотепер залишається предметом дискусій. Беззаперечно одне — наявність гетерохроматину в геномах майже усіх видів свідчить про його необхідність. Таким чином, дослідження закономірностей появи хромосомних аберацій, зокрема розривів, і уточнення місця локалізації у конкретній хромосомі дає змогу передбачити їх фенотипові наслідки у тварин.

Мета досліджень — дослідження частоти участі індивідуальних хромосом у конститутивних цитогенетичних аномаліях великої рогатої худоби.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом дослідження були лімфоцити периферійної крові 50-ти корів української червоно-рябої

молочної породи ДП «ДГ «Христинівське» Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Цитогенетичні дослідження проводили на препаратах метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові за стандартною методикою Moorhead P. et al. [8].

Постановка культури лімфоцитів периферійної крові передбачала виконання низки етапів: культивування лімфоцитів периферійної крові, стимульованих фітогемаглютиніном («Sigma», США), у суміші поживного середовища RPMI 1640 («Sigma», США) протягом 72-х год у термостаті за температури +37°C. Зупинку мітозів проводили на 70-му часі культивування внесенням Колхіцину («Serva», Німеччина) у концентрації 0,1 мкг/мл. Після гіпотонічної обробки KCl («Merck», Німеччина) протягом 20 хв клітини фіксували сумішшю етанолу та крижаної оцтової кислоти (3:1). Клітинну суспензію капали на вологі охолоджені предметні скельця та висушували. Ідентифікували хромосоми на гомогенно забарвлених барвником Гімза («Fluka», Швейцарія) препаратах. За відбору метафазних пластинок для хромосомного аналізу керувалися загальноприйнятими критеріями [9]. Аналіз метафазних пластинок хромосом проводили за допомогою біокулярного мікроскопа фірми «Carl Zeiss» Jena (Німеччина).

Диференційне фарбування хромосом проводили за методикою Seabright M. [10].

Хромосоми каріотипів досліджених тварин підрозділяли відповідно за їх розмірами на три групи: А (1–4 з довжиною 5,3–4,0 мк); В (5–20 пари з довжиною 2,0–3,02 мк); С (21–29 пари — 1,2–1,9 мк, X). Хромосома У визначалась як самостійна. Ідентифікацію G-диференційно пофарбованих індивідуальних хромосом та їхніх перебудов здійснювали відповідно до Атласу [11].

Результати досліджень обробляли біометрично за методами варіаційної статистики з використанням стандартного пакета прикладних статистичних програм.

Результати досліджень. Аналізуючи метафазні хромосоми досліджених тварин, виявили аберації хромосоми за хромосомним і хроматидним типами. Із 1085-ти препаратів метафазних хромосом у 144-х виявлено аберації: розриви, фрагменти, передчасне розходження центромер, анеуплоїдія, поліплоїдія (табл. 1).

1. Частота хромосомних аберацій у корів української червоно-рябої молочної породи (n=50)

Типи аберацій		Частота, %
Хроматидного типу:	Одиночні фрагменти	4,20±0,8
Хромосомного типу:	Парні фрагменти	4,20±0,8
	Розриви	3,12±0,1
	Передчасне розходження центромер	4,25±0,3
	Анеуплоїдні клітини	4,46±0,73
	Поліплоїдні клітини	0,67±0,18
Усього	Частота хромосомних аберацій	13,2±0,51

Рівень хромосомних аберацій становив 13,2%, частота аберацій на одну клітину — 0,131.

Проведений аналіз диференційно забарвлених хромосом тварин установив, що розриви відбуваються в різних хромосомах з різною частотою (табл. 2). Зміни у структурі хромосом виявили в 30-ти із 58-ми аутосом каріотипу досліджених тварин.

Найчастіше спостерігали розриви хромосом: 1-ї (20% усіх випадків), 2- (16), 13- (8,5) і 21-ї (7%), які сумарно становлять понад 50% усіх виявлених хромосомних аберацій.

Це узгоджується з даними ряду вчених [12–15], які зазначають, що частота участі хромосом у внутріхромосомних пошкодженнях певною мірою асоційована з кількістю в них ДНК і їх довжиною. Однак довжина хромосом є лише одним із факторів, що впливають на розподіл цитогенетичних аномалій у геномі, і далеко не завжди має визначальний характер.

Хромосомні та хроматидні аберації групи А представлено в основному перебудовами 1- і 2-ї хромосом із частотою вищою, ніж у хромосом інших груп (табл. 3).

У групі В найчастіше виявляли хромосомні аберації 6- і 13-ї хромосом.

Хромосоми групи С рідко мають розриви, але частіше ніж великі залучаються в передчасне розходження центромер і анеуплоїдію.

У результаті досліджень нами не виявлено хромосомних аберацій у хромосомах дрібного розміру. Аналогічний ефект спостерігали і в дослідженнях у медичній цитогенетиці

[16, 17]. Пошкодженнь статевих хромосом не виявлено.

М. Кочнева зі співавторами [3] проаналізували частоту залучення хромосом каріотипу великої рогатої худоби в транслокації та відзначають, що аутосоми із пар 1-ї, 8-, 9- і 11-ї частіше, ніж хромосоми із пар 2-ї, 4-, 20-, 21-ї та статеві хромосоми, беруть участь у таких перебудовах.

Дослідженнями каріотипу лабораторних шурів доведено, що найчастіше в хромосомних абераціях задіяні хромосоми 3, 7, 10, 11 і 13 [18].

За результатами аналізу диференційно пофарбованих препаратів хромосом установили, що найчастіше розриви хромосом відбуваються в місцях між еу- і гетерохроматиновими сегментами. Це свідчить, що, як правило, неушкодженими частіше залишаються еухроматинові райони, де локалізуються масиви генів. У крупних акроцентриках розриви найчастіше концентрувались у ділянках гетерохроматину в середній третині хромосоми.

Висока частота розривів у структурному гетерохроматині може бути внаслідок деяких фізико-хімічних особливостей гетерохроматину, які відрізняють його від еухроматинових районів хромосом. На думку деяких авторів, конденсований стан гетерохроматину зумовлює гіршу доступність місць первинних пошкодженнь для ферментів системи репарації [19, 20]. У результаті, якщо спочатку передмутаційні події і були розміщені вздовж хромосоми випадково, то, зрештою, розриви виявляються

2. Частота аберацій у каріотипах корів української червоно-рябої молочної породи

Досліджено метафаз			У т.ч. частота аберацій хромосом у групах за довжиною, %			
усього	аберантних, %	у т.ч. з розривами, %	А	В	С	X, Y
1085	13,2±0,51	8,52±0,33	6,71±0,40	4,62±0,62	1,87±0,09	Не виявлено

3. Участь індивідуальних хромосом у різних типах хромосомних аберацій у тварин

Групи хромосом	Хромосома	Вид аберації			
		хромосоми		окремої хроматиди	
		аберація	кількість	аберація	кількість
А	1	Розриви	5	Розриви	10
		Нестачі	3	Нестачі	5
	2	Асоціації з іншими хромосомами	2	Фрагментація	5
		Розриви	3	Розриви	6
В	6	Нестачі	2	Нестачі	2
		Асоціації з іншими хромосомами	3	Фрагментація	4
	13	Розриви	4	Розриви	7
С	21	Асоціації з іншими хромосомами	1	Розриви	2
		22	Передчасне розходження центромер	6	–
		Асоціації з іншими хромосомами	1	Не виявлено	0

локалізованими переважно в гетерохроматині. Різномасштабність реплікації генома в гетеро-і еухроматинних ділянках може створювати в місцях їх фізичного контакту певну фізичну напругу і тому частина розривів виникає на межі еухроматину і гетерохроматину за принципом «рветься там, де тонше».

С. Thomas вважає, що аберації хромосом у вищих тварин досить рідко пошкоджують

структурні гени [21]. Це підтверджують К. Tartof et al. і уточнюють, що вплив аберацій хромосом відбувається в основному через ефект положення [22].

Отже, цитогенетичний метод аналізу аберацій хромосом і нині залишається найдоступнішим і адекватним для розуміння молекулярних процесів, які визначають розриви й інші перебудови хромосом.

Висновки

Експериментальні дані, одержані в результаті дослідження участі індивідуальних хромосом у конститутивних цитогенетичних аномаліях великої рогатої

худоби, свідчать про те, що оцінка їхньої участі може бути використана як один з показників неспецифічної дестабілізації хромосомного апарату тварин.

Дзицюк В.В.¹, Гузеватий О.Е.²

¹ Інститут розведення і генетики живих тварин імені М.В. Зубця НААН, ул. Погребняка, 1, Чубинське Бориспольського р-на Київської обл., 08321, Україна, ² Національна академія аграрних наук України, ул. Михаила Омеляновича-Павленка, 9, г. Київ, 01010, Україна; e-mail: ¹valentynadzitsiuk@gmail.com, ²oleg_guzevatiy@ukr.net

Участь індивідуальних хромосом в конститутивних цитогенетических аномаліях крупного рогатого скота

Цель. Исследование участия индивидуальных хромосом в конститутивных цитогенетических аномалиях крупного рогатого скота. **Методы.** Культивирование лимфоцитов, приготовление цитогенетических препаратов. Классификацию и учет абераций хромосом осуществляли

по общепринятым методикам. **Результаты.** Исследована частота участия отдельных хромосом в хромосомных перестройках. Установлено, что чаще всего встречаются разрывы хромосом: 1-й (20%), 2- (16), 13- (8,5) и 21-й (7%). По результатам анализа дифференциально окрашенных препаратов хромосом установили, что разрывы происходят в местах между зу- и гетерохроматиновыми сегментами хромосом. **Выводы.** Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что частота участия индивидуальных хромосом в конститутивных цитогенетических аномалиях может быть использована в качестве показателя неспецифической дестабилизации хромосомного аппарата животных.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, кариотип, цитогенетический анализ, лимфоциты, аберации хромосом.

Dzitsiuk V.¹, Guzevatyi O.²

¹M. Zubets Institute of animal breeding and genetics of NAAS, Pohrebniak Str., 1, Chubinske, Boryspil area, Kyiv oblast, 08321, Ukraine, ²National academy of agrarian sciences of Ukraine, Mykhailo Omelianovych-Pavlenka Str., 9, Kyiv, 01010, Ukraine; e-mail: ¹valentyndzitsiuk@gmail.com, ²oleg_guzevatyi@ukr.net

Participation of individual chromosomes in constitutive cytogenetic abnormalities of cattle

The purpose. To study participation of individual chromosomes in constitutive cytogenetic abnormalities of cattle. **Methods.** Cultivation of lymphocytes, preparation of cytogenetic specimens. Grading and the record-keeping aberrations of chromosomes was realized under practical standards. **Results.** The frequency of participation of individual chromosomes

in chromosomal rearrangement were studied. It was found that the most frequently happening chromosomal breaks were the following: 20.0% for the first chromosome, 16.0%, for the second one, 8.5% and 7.0% for the thirteenth and the twenty-first chromosomes accordingly. The breaks occurred in places between euchromatin and heterochromatin chromosome segments, as it was displayed by the results of differently colored samples analysis. **Conclusions.** The gained experimental data testify to the following: frequency of participation of individual chromosomes in constitutive cytogenetic abnormalities can be used as an index of non-specific destabilization of the chromosomal apparatus of animals.

Key words: cattle, karyotype, cytogenetic analysis, lymphocytes, aberrations of chromosomes.

Бібліографія

1. Яковлев А.Ф. Цитогенетическая оценка племенных животных. Москва: Агропромиздат, 1985. 256 с.
2. Эрст Л.К., Жигачев А.И. Профилактика генетических аномалий крупного рогатого скота. Москва: Агропромиздат, 1990. 240 с.
3. Nadeau J.H., Taylor B.A. Lengths of chromosomal segments conserved since divergence of man and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1984. 81. P. 814–818.
4. Коваленко В.В. Мутационные спектры у необлученных и облученных детей и потомков облученных родителей (второе поколение) в связи с аварией на ЧАЭС. *Наук.-метод. журн. Миколаїв. ЧДУ ім. Петра Могили: наук. праці. Екологія*. 2012. 194(206). С. 144–148.
5. Андреев С.Г., Эйдельман Ю.А. Пути обменных взаимодействий повреждений, приводящих к внутрихромосомным абберациям, зависящих от структуры интерфазных хромосом. *Радиац. биология. Радиозоология*. 2001. Т. 41, № 5. С. 469–474.
6. Кочнева М.Л., Жиденова А.Н., Билтуева Л.С., Киселева Т.Ю. Новый случай реципрокной транслокации гер(13:26) у крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2011. № 6. С. 84–89.
7. Morad M., Jonasson J. Distribution of mitomycin induced breaks on human chromosomes. *Hereditas*. 1973. V. 74. P. 273–282.
8. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Batipps D.M., Hungerford D.A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 1960. N. 20. P. 613–616.
9. Cribiu E.P., Berardino D. Di, Di Meo G.P., Eggen A., Gallagher D.S., Gustavsson I., Hayes H., Iannuzzi L., Popescu C.P., Rubes J., Schmutz S., Stranzinger G., Vaiman A., Womack J. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB). *Cytogenet Cell Genet*. 2001. 92. С. 283–299.
10. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971. № 11. P. 971–972.
11. Графодатский А.С., Раджабли С.И.

- Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. Атлас. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1988. 128 с.
12. Настюкова В.В., Степанова Е.И., Глазко В.И. Цитогенетические эффекты у детей при разных условиях воздействия малых доз радиации. *Цитология и генетика*. 2002. № 6. С. 38–45.
13. Vogel F., Motulsky A.G. Humah genetics: Problem and approaches. *Spengler — Verlag*. Berlin. German, 1996. Т. 22, № 1. С. 67–72.
14. Toul N., Elhjouji A., Thierens H., Kirsch-Volders M. Analysis of chromosome loss and chromosome segretion in ctokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. *Mutagenesis*. 2000. V. 15, № 1. P. 1–7.
15. Ильинских Н.Н., Бочаров Е.А., Ильинских И.Н. Инфекционный мутагенез. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1984. 160 с.
16. Vig B.K. Sequence of centromere separation: occurrence, possible, significance and control. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1983. V. 8, № 3. P. 249–274.
17. Tarnok A., Mehes K., Kosztolanyi G. No effect of vanadate on centromere separation sequence. *Acta Biol. Hung.* 1993. V. 44, № 2–3. P. 297–301.
18. Haus Olga. Chromosome aberrations in phenotypically different rat rhabdo 127 с myosarcoma cell lines. *Clin. Genet.* 1985. V. 28, № 5. С. 435.
19. Кузнецова С.М., Гур'янова Н.В., Калашников М.В. Хромосомный поліморфізм: біологічні та медичні аспекти. *Цитология и генетика*. 1996. Т. 30, № 2. С. 67–74.
20. Лежава Т.А. Гетерохроматизация — один из ведущих факторов старения. *Цитология и генетика*. 1980. Т. 14, № 3. С. 71–76.
21. Thomas C.A. The theory of the master gene. The neurosciences second study program. Ed. F.O. Schmitt. *Rock. Univ. press*. 1970. N. 4. P. 102–121.
22. Tartof K.D., Bishop C., Jones M. et al. Towards an understanding of position effect variegation. *Devel. genetics*. 1989. V. 10. P. 162–176.