

УДК 575.15

Микроядерный тест как метод определения сезонной изменчивости цитогенетических показателей у млекопитающих

Оксана Ковалева, Надежда Кобозева, Елена Бурдо, Татьяна Глазко

Micronuclei test as method of definition the seasonal alteration of cytogenetic characteristics in mammals. — Kovalova O.¹, Kobozeva N.¹, Burdo O.², Glazko T.¹ — The analysis of cytogenetic anomalies frequency in peripheral blood cells at different mammal kinds show that evaluation of chromosomal apparatus destabilization may depend on season (as for cattle), especially by such character as erythrocytes with micronuclei. The frequencies of cytogenetic anomalies may also depend on genotypic component (established for laboratory mice).

Key words: micronuclei test, season, cytogenetic anomalies.

Address: ¹ Institute of Fisheries UAAS, 135 Obuhovskaja str., Kyiv, 03164, Ukraine, ² Institute for Nuclear Research NASU, 47 prosp. Nauky, Kyiv, 03680, Ukraine. E-mail: strukov2002@mail.ru.

Генетическая обусловленность функций нейроэндокринной и иммунной систем, влияющая на частоту возникновения и элиминации клеток с цитогенетическими аномалиями осложняется тем, что состояние и реактивность самих этих систем имеют широкую изменчивость в связи с сезоном. То есть, результаты оценки частоты встречаемости клеток с различными типами цитогенетических аномалий и в контрольных условиях, и под влиянием экспериментальных воздействий может существенно зависеть от сезона проведения экспериментов. Сезонные изменения сопровождаются глубокими физиологическими перестройками в деятельности желез внутренней секреции, половых желез, состава крови и т. д. Проведено исследование по влиянию сезонной изменчивости на уровень липидных пероксидов и глутатионо-пероксидазной активности в тканях нормальных и адриамицин-обработанных мышей (Silvano, 1994). В сердце уровень липидных пероксидов и глутатионо-пероксидазной активности в ноябре, декабре и январе был более низкий чем в другие месяцы. В течение того же самого периода, уровень липидных пероксидов был выше, а глутатионо-пероксидазная активность ниже в сердце мышей после обработки адриамицином. Автор предполагает, что вызванная адриамицином кардиотоксикация связана с повышенным уровнем липидных пероксидов в сердце мышей, который встречается чаще зимой.

Существование годовой и сезонной зависимости частот встречаемости различных цитогенетических характеристик показано в ряде работ. Например, у человека описано наличие годовой и сезонной изменчивости частот встречаемости цитогенетических аномалий в соматических клетках (Rubes, 1991, Anderson, 1991). Некоторые авторы обращают внимание на то, что максимальное количество хромосомных aberrаций зафиксировано в декабре и январе, а минимальное — в сентябре и октябре (Бочков, 2001). В исследованиях других авторов обнаружено, что максимальный уровень aberrантных клеток зафиксирован в осенний период, а минимальный в весенний (Rubes, 1991). Исследованию сезонной зависимости соматического мутагенеза в литературе уделено мало внимания. Имеющиеся данные получены на основании подсчета aberrантных клеток периферической крови. Однако до сих пор не проведен комплексный анализ частот встречаемости различных цитогенетических характеристик. В связи с этим, целью нашей работы был цитогенетический анализ клеток периферической крови у представителей крупного рогатого скота голштинской породы и клеток костного мозга у линейных мышей, взятых в анализ в разные сезоны исследования.

Материалы и методы. Выполнен цитогенетический анализ в мазках крови черно-пестрых голштинов из 4-х хозяйств: «Степное» Полтавской обл. (34 экз.), «Пасечное» Хмельницкой обл. (15 голов), Агрофирмы «Киевская» Макаровского района, Киевской обл. (30 голов), а также «Дзвинкове» Киевской обл. (7 голов). Рассматривали частоту встречаемости следующих цитогенетических характеристик: эритроцитов с микроядрами (ЭМЯ), одноядерных лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ) и двуядерных лимфоцитов (ДЛ) (в %). Для исследования сезонной изменчивости объединены также полученные ранее данные по микроядерному тесту к клеткам костного мозга у мышей линий BALB/c (31 экз.) и C57Bl/6 (29 экз.).

У коров каплю периферической крови разводили физиологическим раствором (1:1) и на предметных стеклах готовили мазки. Мазки фиксировали метиловым спиртом и высушивали при комнатных условиях, затем окрашивали красителем Гимза. У мышей частоту одноядерных лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ), двуядерных лимфоцитов (ДЛ), апоптотных (А) и делящихся клеток (МИ) (в %) подсчитывали на препаратах костного мозга в клетках, сохранивших цитоплазму. Для анализа клеток использовали бинокулярный микроскоп фирмы Carl Zeiss Jena при увеличении в 1000 раз. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Информация о загрязнении территорий получена из Атласа радиационного загрязнения (2002).

Результаты и обсуждение. Полученные данные частот встречаемости выше перечисленных характеристик у представителей голштинской породы из разных хозяйств Украины, взятых в анализ в разные сезоны исследования, представлены в табл. 1. Обнаружено, что у животных АФ «Киевская» (зимой) частота встречаемости эритроцитов (ЭМЯ) ($P < 0,001$) и лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ) ($P < 0,05$) достоверно ниже, чем у животных из трех других хозяйств (летом). Частота встречаемости двуядерных лимфоцитов (ДЛ) также достоверно ниже у животных АФ «Киевская» (зима), чем в хозяйстве «Степное» (лето) ($P < 0,001$), однако не отличается по значениям от животных из хозяйства «Пасечное» (рис. 1). Повышенная частота встречаемости двуядерных клеток (ДЛ) и лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ) в периферической крови животных хозяйства «Степное» может быть связана с неблагоприятными условиями содержания. Известно, что уровень загрязнения почв Полтавской обл. цезием-137 выше, чем Хмельницкой обл. (Ковальова, 2003). Отличие животных из хозяйства «Степное» от животных из других хозяйств по встречаемости двуядерных лимфоцитов (ДЛ) и лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ) может быть обусловлено генотоксическим воздействием Cs-137. Таким образом, частота встречаемости эритроцитов с микроядрами, очевидно, является показателем, наиболее реагирующем на сезонные изменения.

Таблица 1. Количество эритроцитов (ЭМЯ) и лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ), а также двуядерных лимфоцитов (ДЛ) на 1000 клеток у черно-пестрых голштинов из разных хозяйств

Хозяйство	ЭМЯ	ДЛ	ЛМЯ	Дата взятия
«Пасечное»	5,7±0,5	2,3±0,5	2,0±0,3	20.06.2003
«Степное»	5,3±0,2	5,8±0,5	3,2±0,4	04.06.2003
АФ «Киевская»	1,1±0,2	2,1±0,1	1,9±0,2	19.01.2005
«Дзвинков»	6,0±0,5	–	–	23.08.1991

Таблица 2. Сезонная изменчивость частот встречаемости разных характеристик микроядерного теста в клетках костного мозга у молодых мышей (3 мес.)

Линия	Сезон	Кол-во животных	Частота на 1000 одноядерных лейкоцитов (%)		
			ЛМЯ	ДЛ	Митозов
BALB/c	январь–апрель 1998 г.	5	9,0±1,1	5,8±1,2	6,6±1,3
BALB/c	июль 1998 г.	10	4,0±1,0	2,2±0,5	4,8±0,5
C57Bl/6	март–апрель 1998 г.	5	5,6±0,9	3,4±0,6	5,4±1,0
C57Bl/6	июль 1998 г.	9	3,7±0,7	1,8±0,5	6,5±0,7

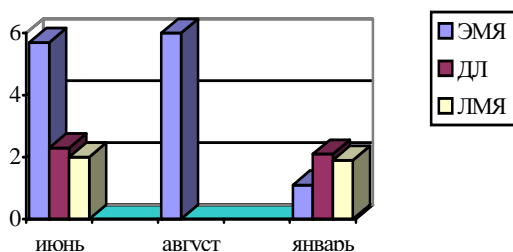


Рис. 1. Сезонные изменения частот встречаемости ЭМЯ, ДЛ и ЛМЯ в клетках периферической крови у черно-пестрых голштинов.

Таблица 3. Сезонная изменчивость частот встречаемости разных характеристик микроядерного теста в клетках костного мозга у старых мышей (12 мес.)

Линия	Год	Кол-во животных	Частота на 1000 одноядерных лейкоцитов (%)			
			ЛМЯ	ДЯЛ	митозов	апоптозов
ВАLB/c	октябрь 1997	2	1,6±1,3	4,3±0,3	3,3±2,7	1,5±0,5
ВАLB/c	апрель 1998	9	4,0±1,4	1,5±0,4	1,7±0,5	1,6±0,3
C57Bl/6	сентябрь 1997	2	5,8±0,2	3,0±1	1,1±0,8	2,6±1,3
C57Bl/6	январь 1998	3	5,9±0,6	2,4±1	5,9±0,4	1,8±0,8
C57Bl/6	апрель 1998	5	4,2±0,7	1±0,3	0,7±0,2	0,7±0,2

Таблица 4. Годовая изменчивость частот встречаемости разных характеристик микроядерного теста в клетках костного мозга у молодых мышей

Линия	Год	Кол-во животных	Частота на 1000 одноядерных лейкоцитов (%)		
			ЛМЯ	ДЯЛ	Митозов
ВАLB/c	январь–апрель 1998	5	9,0±1,1	5,8±1,2	6,6±1,3
ВАLB/c	февраль 2003	5	4,2±0,8	5,6±0,8	2,6±0,5
C57Bl/6	март-апрель 1998	5	5,6±0,9	3,4±0,6	5,4±1,0
C57Bl/6	март 2003	5	3,8±1,2	6,8±1,1	5,0±2,3

Мышей лабораторных линий разводят в условиях вивария, при этом на протяжении сезона не изменяется режим питания и содержания. Поэтому, изучая сезонную изменчивости на лабораторных животных, можно получить наиболее объективные данные. В таблице 2 представлены данные микроядерного теста в клетках костного мозга у молодых мышей линий ВАLB/c и C57Bl/6, взятых в анализ в зимне-весенний и летний период. У молодых животных частоты встречаемости лейкоцитов с микроядрами (ЛМЯ) и двуядерных лейкоцитов (ДЯЛ) у обеих линий ниже в летний период, по сравнению с зимним (у линии ВАLB/c — ЛМЯ ($P < 0,01$), ДЯЛ ($P < 0,05$), у линии C57Bl/6 — ДЯЛ ($P < 0,05$)). У старых животных линии ВАLB/c в весенний период частота встречаемости двуядерных лейкоцитов достоверно ниже, чем осенью ($P < 0,001$). У мышей линии C57Bl/6 в зимний период частота клеточных делений статистически достоверно выше, чем в другие сезоны ($P < 0,05$) (табл. 3).

Важно отметить, что в один и тот же сезон, но в разные года взятия проб, также наблюдается изменчивость частот встречаемости цитогенетических характеристик. К 2003 году, по сравнению с 1998 г., у молодых мышей обеих линий частоты ЛМЯ и делящихся клеток снижается, причем у мышей линии ВАLB/c статистически достоверно ($P < 0,01$ и $P < 0,05$, соответственно), а частота ДЯЛ увеличивается только у линии C56Bl/6 ($P < 0,05$) (табл. 4).

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать следующее заключение:

1) у черно-пестрых голштинов только частота эритроцитов с микроядрами имеет сезонную зависимость, причем наименьшее их число наблюдается в зимний период;

2) у молодых мышей обеих линий частоты лейкоцитов с микроядрами и двуядерных лейкоцитов циклично изменяются в связи с сезоном исследования, уменьшаясь к летнему периоду и увеличиваясь к зимнему, и имеют годовую зависимость;

3) у старых мышей линии BALB/c частота встречаемости двуядерных лейкоцитов также циклично изменяется в связи с сезоном исследования, увеличиваясь к осеннему периоду и уменьшаясь к весеннему.

Литература

- Атлас* радиационного загрязнения Украины. — Киев: ТОВ «Інтелектуальні Системи ГЕО», 2002.
- Бочков Н. П., Чеботарев А. Н., Катосова Л. Д. и др. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Вестник РАМН. — 2001. — Том 37, № 2. — С. 21–29.
- Ковальова О. А., Глазко Т. Т., Якименко Л. П. Мікроядерний тест у великих та дрібних ссавців // Вісник Державного агрокологічного університету. — 2003. — № 2. — С.77–85.
- Anderson D. A., Francis A. J., Golbert P., Jenkinson P. C. Chromosome aberrations (CA), sister-chromatid (SCE) and mutagen-induced blastogenesis in cultured peripheral lymphocytes from 48 control individual sampled 8 times over years // *Mutat. Res.* — 1991. — Vol. 250. — P. 467–476.
- Rubes J., Horinova Z., Gustavson I., Borkovec L., Urbanova J. Somatic chromosome mutations and morphological abnormalities in sperms of boards // *Hereditas.* — 1991. — Vol. 115. — P. 139–143.
- Silvano P., Milvia C. Chicca, Muzzoli M., Papi A., Leonardo M. F., Ciaccia A. Oxygen radical scavengers inhibit clastogenic activity induced by sonication of human serum // *Free Radical. Biology & Medicine.* — 1994. — Vol. 16, No. 3. — P. 363–371.