

УДК 577.21:636.082.12

БИОМАРКЕРЫ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ У ЖИВОТНЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВИДОВ

Т.Т. ГЛАЗКО¹, Г.Ю. КОСОВСКИЙ², В.И. ГЛАЗКО¹

(¹ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;² ГНУ Центр экспериментальной
эмбриологии и репродуктивных биотехнологий РАСХН)

Выполнен анализ влияний на результативность микроядерного теста возраста животных, сезона исследований, видовой принадлежности, эколого-географических условий воспроизводства. Анализируется вклад в изменчивость оценок геномной нестабильности генетической и паратипической компонент.

Ключевые слова: микроядра, мутагенез, геномная нестабильность, репродукция, естественный отбор.

Эффективность животноводства в существенной степени зависит от генетического благополучия племенных животных. Особую важность контроль репродуктивной функции приобретает в условиях нарастающего антропогенного загрязнения, а также широкого использования интродукции животных высокопродуктивных пород в новых эколого-географических условиях. По результатам многих исследований [1, 3, 4], нарушение воспроизводительной функции животных сельскохозяйственных видов, а также смертность новорожденных в настоящее время являются основными проблемами дальнейшего повышения продуктивности животноводства. Не последнюю роль при этом играет нестабильность генетического аппарата производителей, которая может иметь как генетическую, так и паратипическую обусловленность [2, 12].

Накоплены данные о том, что повышенный уровень частоты встречаемости клеток с цитогенетическими аномалиями в периферической крови статистически достоверно коррелирует с количеством морфологически дефектных сперматозоидов [11], с репродуктивными нарушениями и может служить основанием для прогноза повышенной вероятности снижения воспроизводительных функций [1, 5, 7].

Генетическая предрасположенность к низкой оплодотворяющей способности спермы и повышенной смертности новорожденных входит в качестве параметра в расчеты племенного индекса быков при ведении селекционной работы, в частности, с молочным скотом в Скандинавских странах. Некоторые исследователи полагают [3],

что в характеристики племенных животных необходимо вносить показатели мутагенеза в их соматических клетках. В то же время уменьшение стабильности генетического аппарата может быть прямым следствием действия неблагоприятных факторов окружающей среды. Более того, в ряде исследований предлагается использовать сельскохозяйственные виды животных как биоиндикаторные для оценки присутствия экотоксических факторов в их среде обитания [8], поскольку они контактируют с теми же средовыми условиями, что и человек и, кроме того, являются для него источниками продовольственных ресурсов.

Изменение генетической структуры популяций реализуется путем преимущественного размножения носителей определенных генотипов. У млекопитающих описана связь между нестабильностью генетического аппарата, выявляемой на основании частот встречаемости цитогенетических аномалий в клетках периферической крови, и снижением репродуктивной функции [3, 7, 9]. Одним из показателей такой нестабильности является частота встречаемости эритроцитов с микроядрами [5].

Необходимо подчеркнуть, что подсчет клеток с микроядрами является обобщенным показателем разных компонентов мутационных спектров как геномных мутаций — изменений числа хромосом, не связанных с повреждением ДНК молекул, так и других типов мутаций, в основе которых лежат двуцепочечные разрывы ДНК.

Несмотря на очевидные достоинства микроядерного теста для оценки стабильности генетического аппарата, обусловленные его информативностью, доступностью и простотой, до сих пор факторы, оказывающие влияние на его применение, остаются недостаточно исследованными. В этой связи в настоящей работе выполнен сравнительный анализ результатов микроядерного теста в связи с особенностями происхождения животных (принадлежность к разным породам и видам, гибридным популяциям), возрастом животных, сезоном исследований, а также эколого-географическими условиями их воспроизводства.

Материалы и методы

Выполнен цитогенетический анализ в мазках крови черно-пестрого голштинизированного скота из четырех хозяйств: «Степное» Полтавской области (34 гол.), «Пасечное» Хмельницкой области (15 гол.), агрофирмы «Киевская» Макаровского района, Киевской области (30 гол.), а также «Дзвинкове» Киевской области (7 гол.). Группы включали коров, возраст животных варьировал от 3 до 6 лет. Исследования мазков периферической крови местных пород крупного рогатого скота и лошадей (Хорош, Хубсугул, Монголия — биосферный заповедник), местных пород овец и коз (Дархад, Хубсугул, Монголия — биосферный заповедник), яков (Хубсугул, Монголия — биосферный заповедник), местных пород крупного рогатого скота и лошадей, овец, коз и яков (пустыня Южное Гоби, Монголия — зона рискованного животноводства) выполняли на образцах, любезно предоставленных для исследований д.б.н. Ю.А. Столповским (Институт общей генетики РАН).

Представители рысаков, у которых были взяты мазки крови для исследований, принадлежали конезаводу «Поворот В.П.» Московской области, в которых содержались орловские, русские, стандартбредные рысаки и их помеси.

Мазки периферической крови 7 представителей овцебыков были получены у интродуцированной популяции полуострова Таймыр и любезно предоставле-

ны для исследований к.б.и. Т.П. Сиико (Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН).

Мазки крови готовили следующим образом. Каплю периферической крови смешивали с каплей физиологического раствора на предметном стекле в соотношении по объему 1:1, затем распределяли равномерно по всему предметному стеклу. Препараты высушивали и далее фиксировали метиловым спиртом в течение 30 мин. Препараты окрашивали красителем Гимза (фирмы Merk). Рассматривали частоту встречаемости следующих цитогенетических характеристик: эритроцитов с микроядрами (ЭМЯ), одноядерных лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ) и двуядерных лимфоцитов (ДЯЛ) (в %). Количество клеток с микроядрами рассчитывали в 3000 клеток и выражали в промилях (‰, на 1000 клеток). Для исследований препаратов использовали бинокулярный микроскоп фирмы Motik со встроенным цифровым фотоаппаратом при увеличении в 1000 раз.

Статистическую достоверность межгрупповых отличий оценивали по критерию Стьюдента (t_s).

Результаты и их обсуждение

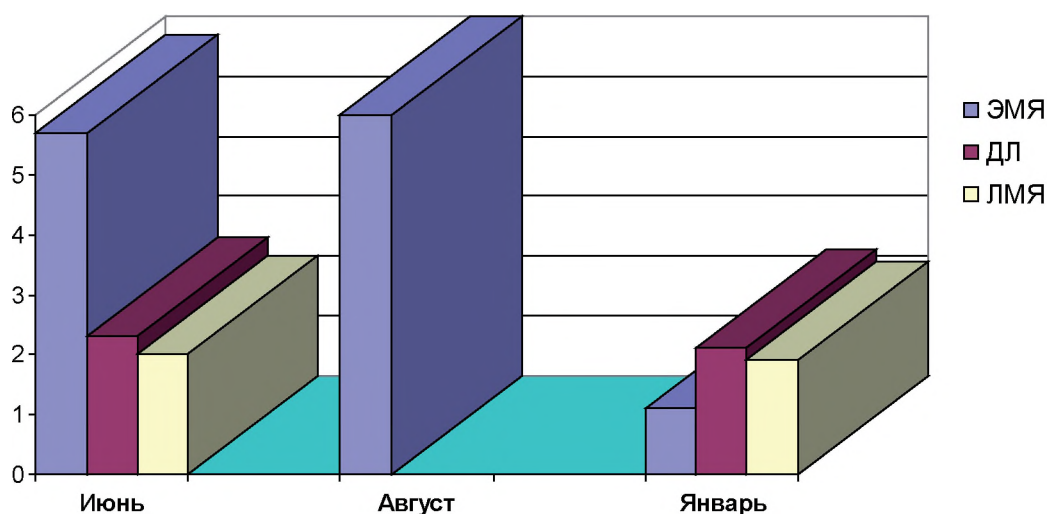
Полученные данные о частоте встречаемости вышеперечисленных характеристик у представителей голштинской породы из разных хозяйств, взятых в анализ в разные сезоны исследования, представлены в табл. 1 и на рисунке. Обнаружено, что у животных АФ «Киевская» (в зимний период) частота встречаемости эритроцитов (ЭМЯ) ($P < 0,001$) и лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ) ($P < 0,05$) достоверно ниже, чем у животных из трех других хозяйств, образцы крови которых получали в летний период. Частота встречаемости двуядерных лимфоцитов (ДЛ) также достоверно ниже у животных АФ «Киевская» (в зимний период), чем в хозяйстве «Степное» в летний период ($P < 0,001$).

Таким образом, частота встречаемости эритроцитов с микроядрами у животных АФ «Киевская» в зимний период достоверно ниже ($P < 0,001$), чем у животных

Таблица 1

Количество эритроцитов (ЭМЯ) и лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ), а также двуядерных лимфоцитов (ДЛ) на 1000 клеток у черно-пестрого голштинизированного скота из разных хозяйств

Хозяйство	ЭМЯ	ДЛ	ЛМЯ
Пасечное	5,7 ± 0,5	2,3 ± 0,5	2,0 ± 0,3
Степное	5,3 ± 0,2	5,8 ± 0,5	3,2 ± 0,4
АФ «Киевская»	1,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2
Дзвинкове	6,0 ± 0,5		



Сезонные изменения частот встречаемости ЭМЯ, ДЛ и ЛМЯ в клетках периферической крови у черно-пестрого голштинизированного скота

из всех других хозяйств в летний период. По частотам встречаемости двух других характеристик достоверных отличий у животных из АФ «Киевская» в зимний период от животных из хозяйства «Пасечное» (образцы взяты в летний период) не обнаружено. Отличие животных из хозяйства «Степное» от животных двух других хозяйств по частотам встречаемости двоядерных лимфоцитов и лимфоцитов с микроядрами могло быть обусловлено несколько повышенным уровнем генотоксического загрязнения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что частота встречаемости эритроцитов с микроядрами оказалась характеристикой, реагирующей на сезон исследования крупного рогатого скота, и ее значения были наименьшими в зимний период. Полученные результаты совпадают с литературными данными о том, что наименьшие частоты встречаемости метафазных пластинок с хромосомными aberrациями у крупного рогатого скота наблюдали в зимне-весенний период по сравнению с летне-осенним [10].

Старение организма обычно связывают с накоплением мутационных событий. Для того чтобы выяснить влияние возраста на спектры цитогенетических аномалий в клетках периферической крови, животные голштинской породы КРС из хозяйства «Степное» Полтавской области (34 гол.) были подразделены на две возрастные группы, одна — «молодые» коровы (3-4 года), и вторая — «старые» животные (6-10 лет).

Полученные результаты представлены в табл. 2.

По таким характеристикам, как частота встречаемости ЛМЯ, ДЛ не обнаружено существенных возрастных отличий, однако наблюдается тенденция к уменьшению частот этих характеристик у старых животных. Статистически достоверно выше были только частоты встречаемости ЭМЯ ($P < 0,05$ и $0,001$ соответственно)

Таблица 2

Частоты встречаемости различных цитогенетических характеристик в клетках периферической крови у представителей крупного рогатого скота двух возрастных групп (в ‰), ЭМЯ — эритроциты с микроядрами; ЛМЯ — лейкоциты с микроядрами; ДЯЛ — двуядерные лейкоциты

Возраст	Количество животных	ЭМЯ	ЛМЯ	ДЯЛ
3-4 года	17	5,0±0,1	3,5±0,3	6,0±0,5
6-10 лет	17	5,7±0,3	2,8±0,5	5,4±0,7

у «старых» коров по сравнению с животными «молодой» группы. Таким образом, из двух характеристик, связанных непосредственно с повреждением хромосомного аппарата (ЭМЯ и ЛМЯ), только эритроциты оказались чувствительными к индукции микроядер, связанной со старением.

Было выполнено также сравнение двухмесячных телят и половозрелых коров местной монгольской породы, разводимой в одном и том же районе заповедной зоны Хубсугула. Получены данные, свидетельствующие о том, что частота эритроцитов с микроядрами у двухмесячных телят статистически достоверно выше ($P < 0,01$), чем у половозрелых животных (3-6 лет) родительской популяции (у телят — $9,5 \pm 1,1\%$, у половозрелых — $4,6 \pm 0,7\%$). По-видимому, это может быть обусловлено относительной незрелостью клеточной компоненты иммунной системы у двухмесячных телят, ответственной за элиминацию эритроцитов с микроядрами. Следует отметить, что в литературе имеются данные о том, что в исследованиях, например, черно-пестрого скота обнаружено увеличение с возрастом частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами [6]. Автор связывает такое повышение с накоплением с возрастом в соматических клетках животных спонтанных мутаций. В то же время не исключено, что направления отличий по частотам встречаемости эритроцитов с микроядрами между группами животных разного возраста, описанные в этой работе и выявленные нами, обусловлены тем, что в наших исследованиях в анализ были включены двухмесячные животные, а в работе О.Н. Семеновой [6] — более зрелой группы в отношении эффективности функции иммунной системы по элиминации эритроцитов с цитогенетическими аномалиями.

Для того чтобы оценить возможное влияние генетической компоненты на изменчивость результатов микроядерного теста в эритроцитах, в наших исследованиях выполнен сравнительный анализ частот встречаемости эритроцитов с микроядрами у половозрелых животных (3-6 лет) местного монгольского крупного рогатого скота, яков и межвидовых гибридов между ними (хайнаков), содержавшихся в одинаковых условиях биосферного заповедника северо-запада Монголии в районе Хубсугул. Такие межвидовые гибриды чаще всего бесплодны, однако у них отсутствуют фенотипически выраженные нарушения развития.

В результате получены следующие данные. Частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови хайнаков статистически достоверно

($P < 0,01$) превышали выявленные у местного крупного рогатого скота ($10,0 \pm 1,1$ % против $4,6 \pm 0,7\%$) ияков ($10,0 \pm 1,1\%$ против $3,2 \pm 0,6\%$), т.е. в одинаковых возрастных группах и условиях окружающей среды частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами у межвидовых гибридов оказывались в 2-3 раза выше, чем у животных родительских видов. Судя по полученным данным, генетическая компонента изменчивости частот встречаемости цитогенетических аномалий в соматических клетках может оказывать существенное влияние на оценки нестабильности хромосомного аппарата животных, что необходимо учитывать при использовании микроядерного теста в качестве биоиндикаторных признаков нестабильности генетического аппарата животных. Полученные данные согласуются с результатами исследований частот соматических клеток с микроядрами у моно- и дизиготных близнецов человека, свидетельствующих о существенном вкладе наследственности в изменчивость этой характеристики [12].

Нами был выполнен также сравнительный анализ частот встречаемости эритроцитов с микроядрами в клетках периферической крови ряда сельскохозяйственных видов млекопитающих, воспроизводящихся в условиях биосферного заповедника Хубсугул (Монголия), и для сравнения оценена частота встречаемости таких эритроцитов у представителя диких видов — овцебыка. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами оказалась статистически достоверно выше ($P < 0,05$) у domesticiрованных видов по сравнению с диким (овцебыки) видом. Увеличение наблюдается в следующей последовательности: овцебыки ($0,3 \pm 0,2\%$), монгольские лошади ($2,4 \pm 0,1\%$), яки ($3,2 \pm 0,6\%$), монгольские местные представители крупного рогатого скота ($4,6 \pm 0,7\%$), козы ($4,6 \pm 0,4\%$), овцы ($5,3 \pm 0,4\%$). Наименьшие значения частот встречаемости эритроцитов с микроядрами выявлены у овцебыков, самые высокие — у овец.

Таким образом, наблюдается определенная тенденция к относительно повышенной геномной нестабильности у domesticiрованных животных по сравнению с диким видом. В пользу этого предположения свидетельствуют также отличия между результатами микроядерного теста у крупного рогатого скота и яков с учетом того, что последние подвергались в общем меньшему давлению искусственного отбора, чем первые.

Для того чтобы оценить влияние разных эколого-географических условий животноводства на стабильность генетического аппарата, на первом этапе нашей работы был выполнен подсчет эритроцитов с микроядрами в мазках периферической крови животных основных сельскохозяйственных видов — у монгольских местных пород крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, яков в условиях биосферного заповедника Хубсугул (Монголия) и в зоне рискованного животноводства пустыни Южного Гоби в целях изучения видоспецифичности ответов на хроническое действие факторов экологического стресса. Получены следующие данные, представленные в табл. 3.

Оценка частот встречаемости эритроцитов с микроядрами свидетельствует о том, что у всех видов в группах животных, воспроизводящихся в условиях зоны рискованного животноводства (Южное Гоби), этот показатель статистически достоверно ниже, чем у групп животных того же вида, воспроизводящихся в более благоприятных условиях (см. табл. 3). Не обнаруживается видоспецифичных статистически достоверных отличий между результатами микроядерного теста. В то же время коэффициенты вариаций в группах животных исследованных видов, воспроизводящихся в экстремальных условиях, как правило, заметно выше, чем у альтернативных.

Таблица 3

Частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами в клетках периферической крови, коэффициент вариации и среднее квадратичное отклонение (C_{Jo}) у групп яков, крупного рогатого скота, овец и коз, воспроизводящихся в условиях зоны рискованного животноводства (Южное Гоби) и биосферном заповеднике Хубсугул

Показатель	Овцы Хубсугул	Овцы Гоби	Яки Гоби	Яки Хубсугул	КРС Гоби	КРС Хубсугул	Козы Гоби	Козы Хубсугул
Количество животных	22	10	7	7	7	7	10	12
Частоты эритроцитов с микроядрами, ‰	$5,3 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,4$
C_v/σ	30,9/1,6	45,6/0,4	~	52,6/1,6	87,7/1,6	40,2/1,8	64,9/0,6	28,3/1,3
$\pm 3\sigma$	10,1–0,5	—	—	8,0–0	—	9,9–0	—	8,5–0,6

Выявленные нами статистически достоверные отличия по частотам встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови у пяти сельскохозяйственных видов животных из разных мест обитания позволяют утверждать, что животные, разводимые в условиях хронического интенсивного давления естественного отбора, отличаются от представителей того же вида, воспроизводящихся в более благоприятных условиях, статистически достоверной относительно повышенной стабильностью хромосомного аппарата. В то же время, судя по вероятностным пределам изменчивости значений микроядерного теста ($\pm 3\sigma$), внутривидовые отличия между средними значениями групп из Хубсугула и Гоби укладываются в эти пределы.

На следующем этапе наших исследований выполнили сравнительный анализ частот встречаемости эритроцитов с микроядрами в клетках периферической крови группы рысаков.

Известно, что русская рысистая порода является результатом длительной селекционной работы с потомством от скрещивания орловских кобыл и жеребцов стандартбредной породы (американского рысака). Кроме того, кобыл орловской породы во второй половине XX в. неоднократно скрещивали с жеребцами американского рысака. Таким образом, все исследованные нами животные имели определенную общность происхождения.

В результате выполненного сравнения по микроядерному тесту получены следующие данные: наиболее высокая частота эритроцитов с микроядрами выявлена у рысаков стандартбредной породы — $4,7 \pm 0,2\%$; затем у помесей русской рысистой со стандартbredами — $4,3 \pm 0,3\%$, далее у русской рысистой — $3,5 \pm 0,3\%$ и у орловских рысаков — $3,2 \pm 0,1\%$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что рысаки стандартбредной породы, судя по результатам микроядерного теста, имеют несколько менее стабильный

генетический аппарат по сравнению с русскими и орловскими рысаками, несмотря на определенную близость по происхождению. Отмечается также относительно повышенная частота встречаемости эритроцитов с микроядрами у помесных животных. Можно ожидать, что контроль по микроядерному тесту относительной стабильности генетического аппарата будет способствовать увеличению успешности воспроизводства животных.

Полученные данные позволяют сделать следующее заключение. Результаты микроядерного теста зависят от возраста исследуемых животных, сезона исследований, от гибридности происхождения и принадлежности к разным видам, а также от условий разведения животных: при относительно повышенной интенсивности действия естественного отбора (в зоне рискованного животноводства пустыни Южного Гоби) в поколениях преимущественно воспроизводятся животные с относительно повышенной устойчивостью генетического аппарата к действию средовых неблагоприятных факторов.

Библиографический список

1. Бакай Ф.Р., Семенов А. С. Анеуплоидия у голштинизированного крупного рогатого скота в связи с показателями воспроизводительной способности // Естественные науки. 2009. №2. С. 189-193.
2. Глазко Т.Т., Дубицкий С.Е., Косовский Г.Ю. Частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках крови крупного рогатого скота // С.-х. биология. Серия биология животных. 2007. № 6. С. 58-63.
3. Жигачев А.П., Эрнст Л.К., Богачев А.С. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам // Сельскохозяйственная биология. 2008. № 6. С. 25-32.
4. Племяшов КВ. Воспроизводительная функция у высокопродуктивных коров при нарушении обмена веществ и ее коррекция: дис. ... д-ра вет. наук / ФГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины. Санкт-Петербург, 2010. 40 с.
5. Семенов А. С. Цитогенетический скрининг в различных популяциях голштинизированного скота: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук / ФГОУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет. Новосибирск, 2010. 38 с.
6. Семенова О.Н. Изменения гематологических, цитогенетических и иммунологических показателей у крупного рогатого скота при лейкозе на фоне анаплазмозной инвазии: дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2004. 137 с.
7. Fenech M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans // Mutagenesis. 2011. Vol. 26. № 1. P. 63-67.
8. Kadmiri M., Glouib K., Verschaeve L., Hilali A. Cytogenetic monitoring of domestic mammals exposed to wastewaters from the localities of Dladla and Boukallou near Settlat, Morocco // Environ Int. 2006. Vol. 32. № 5. P. 690-699.
9. Migliore L., Colognato R., Naccarati A., Bergamaschi E. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study // Mutagenesis. 2006. Vol. 21. № 2. P. 149-152.
10. Rubes J., Borkovec L., Horinova Z., Urbanova J., Prorokova I., Kulikova L. Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution // Mutat. Res. Lett. 1992. 283. №3. P. 199-210.
11. Rubes J., Horinova Z., Gustavson I., Borkovec L., Urbanova J. Somatic chromosome mutations and morphological abnormalities in sperms of boars // Hereditas. 1991. Vol. 115. P. 139-143.

12. Surowy H., Rinckleb A., Luedeke M., Stuber M., Wecker A., Varga D., Maier C., Hoegel J, Vogel W. Heritability of baseline and induced micronucleus frequencies // Mutagenesis. 2011. Vol. 26 № 1. P. 111-117.

BIOMARKERS OF GENOMIC INSTABILITY OF FARM ANIMALS

T.T. GLAZKO¹, G.YU. KOSOVSKY², V.I. GLAZKO¹

(' RSAU-Timiryazev MAA,² Centre of experimental embryology
and reproductive biotechnology of RAAS)

The influence of animal age, season of research, animal's origin, species, ecological and geological conditions of animal's reproduction on the performance of micronuclear test was investigated. The contribution of the genetical and paratypical factors in variability of micronuclear estimates of genomic instability was discussed.

Key words: micronuclei, mutagenesis, genomic instability, reproduction, natural selection.

Глазко Татьяна Теодоровна — д. с.-х. н., проф. каф. разведения и племенного дела РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-34-34; e-mail: tglazko@rambler.ru).

Косовский Глеб Юрьевич — к. м. н., директор ГНУ Центра экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий Российской академии сельскохозяйственных наук (127422, г. Москва, ул. Костякова, 12/4; тел.: (495) 781-45-11; e-mail: info@fcerb.ru).

Глазко Валерий Иванович — д. с.-х. н., проф., акад. РАСХН (иностр. член) руководитель Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. E-mail: vglazkot@yahoo.com.