

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ПТИЦ В ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

М. А. Курса¹, Е. С. Афанасьева², С. Р. Рушковский², Р. А. Барчук³, И. Н. Варенюк²,
О. В. Блюма², В. Ф. Безруков²

¹ ГУ "Украинский антарктический центр", Киев

² Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев

³ Чернобыльский центр по проблемам ядерной безопасности, радиоактивных отходов и радиэкологии, Чернобыль

Проведен анализ цитогенетических параметров нестабильности генома шести видов птиц: большой синицы (*Parus major*), домашней курицы (*Gallus domesticus*), пингвина дженту (*Pygoscelis pappua*), пингвина антарктического (*P. antarctica*), пингвина адели (*P. adeliae*) и южно-полярного поморника (*Catharacta maccormicki*). Мазки цельной крови фиксировали в 96 %-ном метаноле и красили 2 %-ным красителем Гимзы. Анализировали зрелые эритроциты периферической крови. Общее количество клеток, проанализированных для каждой птицы, составляло 10000. Определяли уровень микроядер (МЯ) и аномалий ядра (АЯ). Среди АЯ наиболее часто встречались следующие: почкующееся ядро, двулопастное ядро, хвостатое ядро, ядро с выемкой. Средняя частота МЯ для *P. major* составляла $0,11 \pm 0,02$ ‰, АЯ – $0,70 \pm 0,06$ ‰; для *G. domesticus*: МЯ – 0 ‰, АЯ – $1,14 \pm 0,11$ ‰; для *P. pappua*: МЯ – $0,05 \pm 0,02$ ‰, АЯ – $0,34 \pm 0,06$ ‰; для *P. antarctica*: МЯ – $0,02 \pm 0,01$ ‰, АЯ – $0,68 \pm 0,08$ ‰; для *P. adeliae*: МЯ – $0,17 \pm 0,02$ ‰, АЯ – $0,62 \pm 0,08$ ‰; для *C. maccormicki*: МЯ – $0,01 \pm 0,01$ ‰, АЯ – $0,42 \pm 0,04$ ‰. Обсуждаются видовые особенности цитогенетических параметров нестабильности генома птиц и возможность использования изученных параметров в эколого-генетическом мониторинге.

Введение

Загрязнение окружающей среды вследствие антропогенной деятельности - один из факторов, вызывающих дестабилизацию генома у различных видов, в том числе и человека. В свою очередь нестабильность генома может приводить к всевозможным нарушениям функционирования организма.

В связи с этим возникла необходимость оценки, контроля и прогноза негативных последствий загрязнения. Однако эколого-генетический мониторинг (ЭГМ) загрязнения окружающей среды требует адекватных методов и объектов исследований. Птицы по многим характеристикам - один из перспективных объектов для подобного рода исследований. Это достаточно многочисленный и распространенный класс, занимающий важную позицию в экосистемах регионов и характеризующийся эволюционной стабильностью кариотипа. При этом у птиц в цитогенетических исследованиях можно анализировать зрелые эритроциты периферической крови.

Основная проблема использования птиц как тест-объектов - это недостаточность данных о видовых особенностях нестабильности генома и методах ее оценки. Существует множество различных методов оценки уровня нестабильности генома, но использование большинства ограничивается либо их низкой информативностью, либо материальными затратами. К тому же оценка уровня нестабильности генома в полевых условиях (как в Антарктиде, так и на территориях с уровнем загрязнения, небезопасным для здоровья) сопряжена с некоторыми трудностями (лиматические условия, отсутствие оборудования, ограниченность во времени и возможностях), что требует определенного метода исследования. Таким методом может быть микроядерный тест, информативность, простота и доступность которого обеспечили ему популярность при исследованиях подобного рода [1, 2]. Суть метода состоит в определении частоты МЯ в интерфазных клетках различных тканей, в данном случае в зрелых эритроцитах периферической крови.

Таким образом, целью нашей работы было: 1) выделить цитогенетические параметры нестабильности генома птиц; 2) оценить видовые особенности уровня нестабильности генома птиц; 3) оценить возможность использования комплекса цитогенетических параметров в эколого-генетическом мониторинге.

Материалы и методы

Исследуемые виды

Исследовали мазки крови шести видов птиц, обитающих в разных районах: южно-полярного поморника *Catharacta maccormicki* (27 особей), о. Галиндез в районе западной части Антарктического п-ва;

антарктического пингвина *Pygoscelis antarctica* (6 особей), пингвина адели *Pygoscelis adeliae* (6 особей), пингвина дженту *Pygoscelis papua* (10 особей), о. Петерманн в районе западной части Антарктического п-ва;

большой синицы *Parus major* (18 особей), зона отчуждения ЧАЭС, Украина;

курицы домашней *Gallus domesticus* (7 особей), Киевская обл., Украина.

Пробы крови скуа получены во время австралийского лета 2001 - 2002 гг. в рамках 7-й Украинской антарктической экспедиции (УАЭ), пробы пингвинов – во время австралийского лета 2002 - 2003 гг. в рамках 8-й УАЭ. Пробы синицы и курицы получены в 2003 г.

Приготовление проб

Каплю цельной крови, взятой с 4-го рудиментарного пальца лапы пингвинов, с 5-го рудиментарного пальца лапы поморника и курицы и с крыльевой вены синицы, наносили на предварительно обезжиренное предметное стекло и распределяли по стеклу, чтобы образовался монослой клеток. Препараты подсушивали на воздухе, предотвращая попадание пыли. После этого фиксировали в 96 %-ном метаноле 30 мин и снова подсушивали. Фиксированные препараты хранились в сухом месте до проведения цитогенетического анализа. Непосредственно перед анализом красили 2 %-ным красителем Гимза.

Анализ препаратов и статистическая обработка

Анализировали ядра эритроцитов. Эритроциты учитывали зрелые, достаточно прокрашенные, не перекрывающие друг друга, и только те, у которых четко видны неповрежденные при приготовлении препарата цитоплазма и границы клетки и ядра. В качестве цитогенетических параметров нестабильности генома были выбраны частота микроядер (ЧМЯ) и частота ядерных аномалий (ЧАЯ). Не учитывали апоптоз и пикноз.

Препараты анализировали под световым микроскопом с увеличением 1000. Общее количество клеток, проанализированных для каждой птицы, составляло 10000. Частота встречаемости МЯ и АЯ указана в промиллях (‰). Статистическая обработка проводилась стандартными методами [3].

Результаты и обсуждение

Изученные параметры нестабильности генома

Для зрелых эритроцитов птиц характерно одно ядро, расположенное в центре клетки (рис. 1). Ядро не сегментировано, имеет веретеноподобную форму, наблюдается неравномерность окраски гетеро- и эухроматиновых зон.

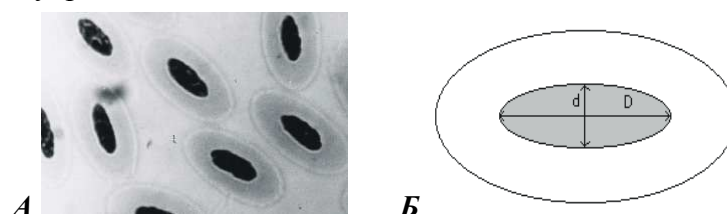


Рис. 1. Зрелые эритроциты с нормальными ядрами. А – фото, Б – схема.

В том случае, если кроме основного ядра наблюдали дополнительную хроматиновую структуру, учитывали ее как **микроядро** (МЯ) при соответствии общепринятым критериям: округлая форма, размер меньше основного ядра и расположено отдельно от него, цвет и структура, аналогичные основному ядру (рис. 2) [1].

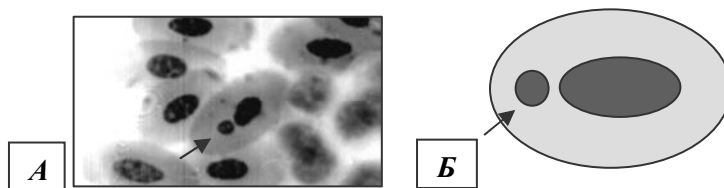


Рис. 2. Зрелый эритроцит с микроядром. А – фото, Б – схема.

Кроме МЯ были зафиксированы отклонения в нормальной морфологии ядра. Выделены те, что встречались с наибольшей частотой и классифицировали их следующим образом:

1. **Почкующееся ядро** (ПЯ) - ядро с перетяжкой, делящей его на две части, одна из которых составляет $1/3 - 1/4$ общего объема ядра; ширина ядра в области перетяжки равна приблизительно $1/3 d$ (рис. 3).

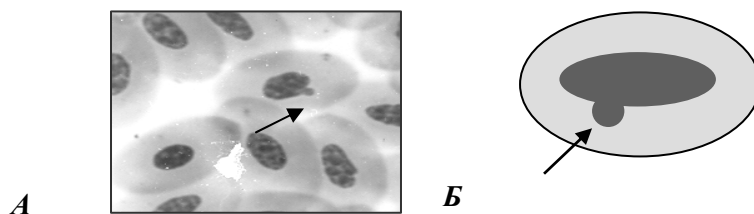


Рис. 3. Зрелый эритроцит с почкующимся ядром. А – фото, Б – схема.

2. **Двулопастное ядро** (ДЯ) - ядро с перетяжкой, которая делит его на две приблизительно равные доли; ширина ядра в области перетяжки $1/3 - 1/2 d$ (рис. 4).

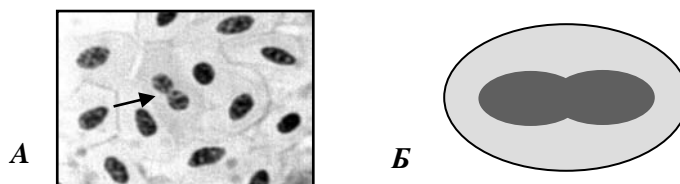


Рис. 4. Зрелый эритроцит с двулопастным ядром. А – фото, Б – схема.

3. **Ядро с выемкой** (ЯВ) - ядро имеет четкую видимую выемку, края которой не соприкасаются, приблизительно до середины оси D (рис. 5).

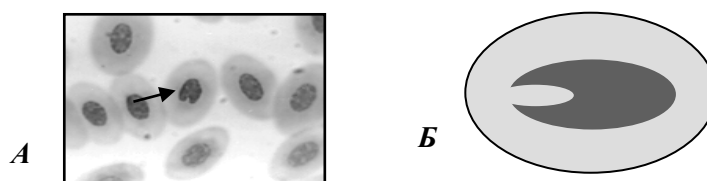


Рис. 5. Ядро с выемкой в зрелом эритроците. А – фото, Б - схема.

4. **Хвостатое ядро** (ХЯ) - один край ядра резко сужен и вытянут. Длина «хвоста» $1/4 - 1/3 D$ (рис. 6).

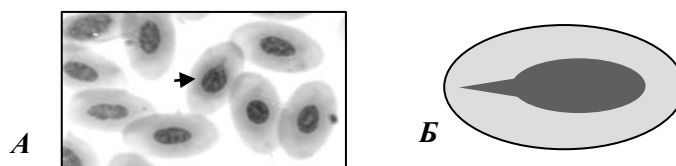


Рис. 6. Зрелый эритроцит с хвостатым ядром. А – фото, Б - схема.

Сравнительный анализ аномалий ядра птиц

Средние значения ЧМЯ у шести видов птиц представлены на рис. 7.

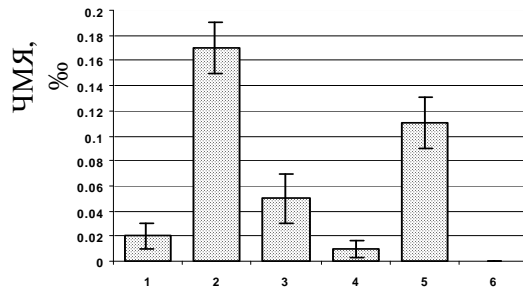


Рис. 7. Средние значения ЧМЯ, ‰: 1 – *P. antarctica*; 2 – *P. adeliae*; 3 – *P. papua*; 4 – *C. macrorhynchos*; 5 – *P. major*; 6 – *G. domesticus*.

Среди исследуемых шести видов птиц среднее значение уровня МЯ колебалось от $0,17 \pm 0,05$ ‰ у *P. adeliae* (также высокий уровень характерен и для ласточки) до 0 ‰ у *G. domesticus*. То, что мы не зафиксировали МЯ только у одного вида, не означает, что МЯ для него не характерны. Этот факт может отображать как особенности вида, так и недостаточность выборки. В то же время в литературе встречается для некоторых видов (*Cassidix melanicterus*, *Forpus cyanopygius*, *Polyborus plancus*) ЧМЯ, равная 0 ‰, при этом у совы *Otus sp.* зафиксирован относительно высокий уровень - 15,8 ‰, но в большинстве случаев частота находится в границах 0,4 – 4,3 ‰ [2]. Литературные данные указывают на то, что по сравнению с человеком и другими млекопитающими для подавляющего большинства птиц, в том числе и исследуемых, характерен низкий уровень ЧМЯ.

МЯ – фрагменты хромосомного материала, наблюдающиеся в интерфазе вне основного ядра и состоящие из ацентрического фрагмента или целой хромосомы. ЧМЯ – общепринятый параметр нестабильности генома и рекомендован для экологического мониторинга. Микроядерный тест удобен простотой забора материала, способом перевозки и хранения, сравнительно экономичный во временных и материальных затратах и позволяет обработать большую выборку [1].

Учитывая низкую ЧМЯ у птиц, в качестве дополнительного параметра нестабильности генома была выбрана сумма АЯ, описанных выше. Средние значения ЧАЯ указаны на рис. 8.

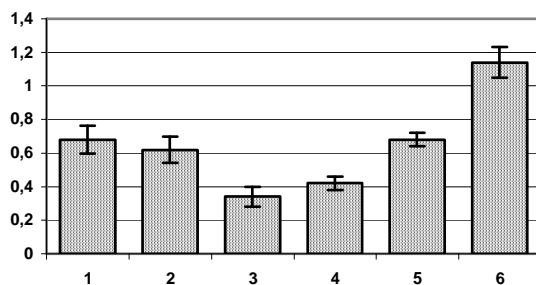


Рис. 8. Средние значения ЧАЯ, ‰: 1 – *P. antarctica*; 2 – *P. adeliae*; 3 – *P. papua*; 4 – *C. macrorhynchos*; 5 – *P. major*; 6 – *G. domesticus*.

Самое низкое значение ЧАЯ наблюдается у пингвина *P. papua* ($0,34 \pm 0,58$ ‰), а высокое у домашней курицы ($1,14 \pm 0,09$ ‰), причем основной АЯ является ЯВ (таблица). У ласточки из зоны отчуждения и двух видов пингвинов из Антарктики (*P. antarctica*, *P. adeliae*) уровень ЧАЯ практически одинаков, но есть некоторые отличия по отдельным аномалиям. Например, при достаточно высоком значении ДЯ у пингвинов, у ласточки эритроцитов с такой аномалией не встречалось.

С методической точки зрения важно выделить, какая АЯ встречается наиболее часто. Для всей группы проанализированных видов этим параметром является ЯВ. Следующие по величине параметры для всех, кроме курицы, это ПЯ и ДЯ, у курицы это ХЯ, а частота ПЯ равна 0.

Средние значения ЧАЯ для шести видов исследуемых птиц, %

Вид	ЧАЯ			
	ПЯ	ДЯ	ЯВ	ХЯ
<i>P. antarctica</i>	0,12±0,04	0,18±0,08	0,38±0,08	0
<i>P. adeliae</i>	0,13±0,05	0,13±0,08	0,28±0,07	0,08±0,04
<i>P. rapua</i>	0,10±0,03	0,09±0,03	0,12±0,04	0,03±0,02
<i>C. maccormicki</i>	0,02±0,01	0,09±0,03	0,12±0,04	0,01±0,01
<i>P. major</i>	0,08±0,02	0	0,46±0,03	0,14±0,02
<i>G. domesticus</i>	0	0,09±0,02	0,71±0,06	0,34±0,04

По своей морфологии **почкующиеся ядра** похожи на описанные в литературе аномалии ядра “broken egg”. Исходя из этого, наиболее вероятной причиной появления ПЯ является амплификация определенной части генома.

Наиболее логичным объяснением появления **двулопастных ядер**, по нашему мнению, может быть amitotическое деление интерфазных ядер, что приводит к неправильному распределению хромосом по дочерним клеткам.

Появление в интерфазе **хвостатых ядер** свидетельствует о наличии дицентричных хромосом, наблюдаемых в метафазе. При делении такие хромосомы образуют хроматиновые мосты между двумя ядрами, что при разрыве может приводить к образованию «хвоста».

Адекватной гипотезы образования **ядер с выемкой** на данный момент мы предложить не можем. При анализе авторы придерживались критериев, описанных выше. Но часто встречались ядра, похожие на ЯВ, но не с такой четкой морфологией. А поскольку причины и процессы их образования не известны и частота встречаемости ядер, похожих на ЯВ, высокая, мы не можем сказать, насколько ЯВ является параметром нестабильности генома. Остальные три ядерные аномалии (ПЯ, ДЯ, ХЯ) описаны для различных организмов и в различных тканях *in vivo* и *in vitro* [4, 5].

Таким образом, считаем, что описанные параметры могут быть использованы при проведении оценки нестабильности генома птиц как в полном, так и в частичном объемах. Обращает на себя внимание видовая специфика спектра АЯ, поэтому при использовании птиц в эколого-генетическом мониторинге необходимо учитывать видовые особенности нестабильности их генома.

Данная работа была частично поддержана грантами INTAS-2001-0517 и УАЦ 04ДФ036-01 (Н/4-2004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tolbert P., Shy C., Allen J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. // Mut. Res. - Vol. 271 – 1992.- P. 69 - 77.
2. Zuniga-Gonzales G., Torres-Bugarin O., Zamora-Perez A. et al. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. // Mut. Res. – Vol. 494 – 2001 - P. 161 - 167.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия. - М.: Высш. шк., 1980. - 293 с.
4. Федорцева Р. Ф., Кравцов В. Ю., Старкова Е. В. и др. “Хвостатые” ядра как возможный экспресс-индикатор нестабильности генома при облучении // Эпидемиологические аспекты Чернобыльской катастрофы: Сб. тез. - 1998. - С.33.
5. Fenech M., Crott J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage – fusion – bridge cycles in the cytokinesis – block micronucleus assay // Mut. Res. - 2002. - Vol. 504. - P. 131 - 136.

Поступила в редакцию 08.11.04,
после доработки - 28.02.05.

25 ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ГЕНОМУ ПТАХІВ В ЕКОЛОГО-ГЕНЕТИЧНОМУ МОНІТОРИНГУ

**М. О. Курса, К. С. Афанасьєва, С. Р. Рушковський, Р. А. Барчук, І. М. Варенюк,
О. В. Блюма, В. Ф. Безруков**

Проведено аналіз цитогенетичних параметрів нестабільності геному шести видів птахів: великої синиці (*Parus major*), домашньої курки (*Gallus domesticus*), пінгвіна дженту (*Pygoscelis papua*), пінгвіна антарктичного (*P. antarctica*), пінгвіна аделі (*P. adeliae*) та південно-полярного поморника (*Catharacta maccormicki*). Мазки крові фіксували в 96 %-ному метанолі та фарбували 2 %-ним барвником Гімзи. Аналізували зрілі еритроцити периферичної крові. Загальна кількість проаналізованих клітин для кожного птаха становила 10000. Визначали рівень мікроядер (МЯ) і аномалій ядра (АЯ). Серед АЯ найбільш часто зустрічались: ядро, що брунькується; дволопастне ядро; хвостате ядро; ядро з виїмкою. Середня частота МЯ для *P. major* становила $0,11 \pm 0,02$ ‰, АЯ – $0,70 \pm 0,06$ ‰; для *G. domesticus*: МЯ – 0 ‰, АЯ – $1,14 \pm 0,11$ ‰; для *P. papua*: МЯ – $0,05 \pm 0,02$ ‰, АЯ – $0,34 \pm 0,06$ ‰; для *P. antarctica*: МЯ – $0,02 \pm 0,01$ ‰, АЯ – $0,68 \pm 0,08$ ‰; для *P. adeliae*: МЯ – $0,17 \pm 0,02$ ‰, АЯ – $0,62 \pm 0,08$ ‰; для *C. maccormicki*: МЯ – $0,01 \pm 0,01$ ‰, АЯ – $0,42 \pm 0,04$ ‰. Обговорюються видові особливості цитогенетичних параметрів нестабільності геному птахів і можливість використання параметрів, що досліджувались, в еколого-генетичному моніторингу.

25 CYTOGENETIC PARAMETERS OF BIRDS' GENOME INSTABILITY IN ECOLOGICAL AND GENETICAL MONITORING

**M. O. Kursa, K. S. Aphanasieva, S. R. Rushkovsky, R. A. Barchuk, I. N. Varenyuk,
O. V. Blyuma, V. F. Bezrukov**

The comparative analysis of genome instability cytogenetic parameters for birds species: Great Tit (*Parus major*), Domestic Chicken (*Gallus domesticus*), Gentoo Penguin (*Pygoscelis papua*), Chinstrap Penguin (*P. antarctica*), Adelie Penguin (*P. adeliae*) and South Polar Skua (*Catharacta maccormicki*) was carried out. Blood smears were fixed in 96% ethanol and were stained with 2% Giemsa stain. The mature erythrocytes (10.000 cells for each bird) of peripheral blood were analyzed. The rates of micronuclei (MN) and nuclear anomalies (NA) were estimated. There are most frequently registered nuclear anomalies (NA): "budding nucleus" (bn), "two-lobe nucleus" (tln), "tailed nucleus" (tn) and "nucleus with cavity" (nc). Average rates of MN are $0,11 \pm 0,02$ ‰, NA – $0,70 \pm 0,06$ ‰ for *P. major*; MN – 0 ‰, NA – $1,14 \pm 0,11$ ‰ for *Gallus domesticus*; MN – $0,05 \pm 0,02$ ‰, NA – $0,34 \pm 0,06$ ‰ for *P. papua*; MN – $0,02 \pm 0,01$ ‰, NA – $0,68 \pm 0,08$ ‰ for *P. antarctica*; MN – $0,17 \pm 0,02$ ‰, NA – $0,62 \pm 0,08$ ‰ for *P. adeliae*; МЯ – $0,01 \pm 0,01$ ‰, NA – $0,42 \pm 0,04$ ‰ for *C. maccormicki*. The species' features of cytogenetic parameters of bird genome instability are discussed. The possibility of studied parameters using to ecological monitoring are proposed.

Курса Марина Алексеевна, старший научный сотрудник ГУ "Украинский Антарктический центр", Киев, тел. 2463883, факс 2463880, kursik@ukr.net.

Афанасьева Екатерина Сергеевна, аспирант кафедры общей и молекулярной генетики биологического факультета, Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, тел.2523995, факс 2523995, aphon@ukr.net

Рушковский Станислав Ричардович, к.б.н., ассистент кафедры общей и молекулярной генетики биологического факультета Киевского национального университета имени Тараса Шевченка, тел.2523995, факс 2523995, rsr@ukr.net

Барчук Рената Анатольевна, Чернобыльский центр по проблемам ядерной безопасности, радиоактивных отходов и радиоекологии, barchuk@chornobyl.net

Варенюк Игорь Николаевич, ассистент кафедры цитологии, гистологии и индивидуального развития Киевского национального университета имени Тараса Шевченка, varenyuk@univ.kiev.ua

Блюма О.В., Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, тел.2523995, факс 2523995

Безруков Владимир Федорович, к.б.н., доцент кафедры общей и молекулярной генетики Киевского национального университета имени Тараса Шевченка, Киев, тел.2523995, факс 2523995, bvf@univ.kiev.ua