ВІСНИК ЛЬВІВ. УН-ТУ *VISNYK OF L'VIV UNIV.*
Серія біологічна. 2002, Вип. 30. С. 23-29 *Biology Series. 2002. Is. 30. P. 23-29*

УДК 575.224+577.21

ВИКОРИСТАННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ МИШОПОДІБНИХ ГРИЗУНІВ ДЛЯ БІОІНДИКАЦІЇ ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЙ

С. Костенко, Т. Глазко

Інститут агроекології і біотехнології УААН,
03143, м. Київ, вул. Метрологічна, 12, glazko@biotech.kiev.ua

Розглянуто проблеми, які виникають у разі біоіндикації забруднених територій за допомогою мишоподібних гризунів. Наведено дані власних досліджень та дані з літературних джерел про цитогенетичні параметри у трьох видів нориць (*Clethrionomys glareolus, Microtus oeconomus*, *M. arvalis*), що живуть на забруднених територіях та в умовах контролю. Відповідь на генотоксичність середовища відбувається через чутливість організації каріотипу виду загалом і через участь окремих хромосом у загальній відповіді на генотоксичні впливи. Морфологія окремих хромосом, наявність хромосомних рас у виду і конститутивних хромосомних аномалій у популяції можуть відігравати суттєву роль під час інтерпретації результатів.

Ключові слова: низькодозове іонізуюче опромінення, хромосомні аберації, мікроядра, цитогенетична мінливість, нориці, *Arvicolidae.*

Вивчення наслідків хронічного впливу забруднювачів на біоту в умовах реальних екосистем потребує наявності біоіндикаторних видів і параметрів, за якими можна оцінити ці наслідки кількісно і якісно. Моніторинг територій за допомогою диких видів мишоподібних гризунів має переваги, пов'язані з тим, що тварини відтворюються в реальних екосистемах, у безпосередньому контакті з водою, верхніми шарами ґрунту, де накопичуються хімічні полютанти, радіонукліди тощо. Більшість видів мишоподібних мають високий ступінь прив'язаності до певної території і харчуються переважно фоновою рослинністю, що важко змоделювати в лабораторії. Врешті, мишоподібні мають короткий репродуктивний період (дві–три генерації на рік), тому можна виявляти динаміку мінливості цитогенетичних параметрів у часі. Як і в лабораторних видів гризунів, у диких видів параметри соматичного мутагенезу оцінюють на клітинах кісткового мозку. Це не потребує додаткових витрат на культивування і дає змогу уникнути методичних помилок, пов'язаних з умовами культивування, живильним середовищем, різними темпами клітинного поділу та інших, а також порівнювати дані, отримані на одній і тій же тканині різних видів, у різних лабораторіях.

© Костенко С., Глазко Т., 2002

Суттєвими недоліками використання соматичного мутагенезу у диких видів гризунів з метою біоиндикації територій є те, що вибірки диких тварин, на відміну від лабораторних, мають високий рівень генетичної мінливості, у тому числі за стійкістю до генотоксичних впливів, не завжди складаються з тварин одного віку і статі. Під час досліджень не враховують можливі міжвидові і внутрішньовидові розходження в чутливості до генотоксичних агентів, що ускладнює інтерпретацію результатів. У індикаторних видів не завжди відомі каріотипові особливості участі певних хромосом у цитогенетичних аномаліях.

З метою оптимізації використання видів мишоподібних гризунів для біоіндикації забруднених територій ми розглянули розмах цитогенетичних параметрів отриманих у нашій лабораторії, та наведених у літературі даних, зосередивши увагу на визначенні контрольного рівня, від значення якого залежить інтерпретація результатів. Для оцінки соматичного мутагенезу традиційно використано такі цитогенетичні показники: частка метафазних пластинок із хромосомними аберраціями (ХА), з анеуплоїдією (А), з асинхронним розщепленням центромерних районів хромосом (АРЦРХ), частка клітин кісткового мозку з мікроядрами (МЯ), частка поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами у периферійній крові.

Частка метафазних пластинок із хромосомними аберраціями. Використання цього параметра для біоіндикації забруднених територій утруднене високим рівнем індивідуальної мінливості [5], а також відсутністю уніфікованого підходу до визначення контрольного або спонтанного рівня клітин із ХА. У літературі, присвяченій цій проблемі, викладено три голвні підходи.

1. У разі оцінювання територій, забруднених хімічними полютантами, контрольним рівнем вважають 0–3% клітин із ХА. Про це свідчать численні цитогенетичні дослідження мишоподібних гризунів, виконані на диких і лабораторних тваринах [3, 4, 6, 7, 14–16, 22]. Наприклад, у рудих нориць із Самарської області виявлено 2,85% клітин із ХА, у *Mus musculus* із Нижньої Волги – 1,72, у *Micromys minutus* – 5 [6, 7], у *Mus musculus* із Гіссарського району – 2,5% [16].

2. Деякі дослідники під час вивчення тварин, що живуть на територіях, забруднених радіонуклідами, за контрольний рівень брали цитогенетичні показники звірів, виловлених у заповідниках. Як звичайно, рівень клітин із ХА в подібних дослідженнях – близько 1%. Для *Clethrionomys rutilus* зі східноуральского радіоактивного сліду (ВУРСа) наводять цифру 0,08±0,07% метафаз із ХА [8], для *Microtus oeconomus* – 0,91±0,47, для *M. oeconomus* – 0,74 [2], для *M. arvalis* – 0,44 [5]. Ці цифри є в інтервалі 0–3% і не перевищують 1%.

3. Цитогенетичні дослідження худоби, яка також, як і гризуни, має контакт з фоновою рослинністю і водою, з індустріальних і сільськогосподарських районів виявили статистично достовірні відмінності за частотою лімфоцитів периферійної крові з ХА. У корів з індустріальних регіонів рівень клітин із ХА становив 5,82%, тоді як у тварин із сільськогосподарських районів — 2,11% [23].

У тварин, що живуть на територіях, забруднених радіонуклідами, рівень метафаз з ХА не перевищує рівня, характерного для мешканців індустріально забруднених регіонів. Рівень ХА в зонах хімічного забруднення відповідає рівню, типовому для індустріально забруднених зон і перевищує його. Наприклад, за даними Р. Лекявічюса, у рудої нориці з деяких районів Литви в разі забруднення ДДТ спостерігали 9,26 і 14,6% клітин із ХА [17]. Отже, цитогенетичний параметр ХА ліпше використовувати для біоіндикації територій, які зазнали хімічного, а не радіонуклідного забруднення.

Частка метафазних пластинок з анеуплоїдією. Контрольний рівень частки метафаз із відхиленнями за кількістю хромосом $\pm$ 1 хромосома коливається від 0,1 до 12%. Такі суттєві відмінності дослідники пов'язують з втратами хромосом у процесі готування цитогенетичних препаратів. Результати використання цього параметра під час біоіндикації забруднених територій свідчать про його видову специфічність. Наприклад у нориці звичайної з регіонів із рівнем забруднення 400–1000 Ки/км^2 ми виявили 24,2% метафаз з анеуплоїдією, що в 3 рази перевищило контрольний рівень для цього виду (7,4%). У нориці сибірської виявлено 12,6% (контроль – 4,1%), а у нориці рудої – 10,2% (контроль – 8,9%) [11]. Під час аналізу участі в анеуплоїдії індивідуальних хромосом у нориці сибірської виявлені частіші втрати хромосом 10 і 14, які різняться за морфологією від більшості мета- і субметацентриків каріотипу цих видів [12].

Частка метафазних пластинок з асинхронним розщепленням центромірних районів хромосом. Цей показник виявився високоінформативним у разі вивчення генотоксичності середовища в умовах 30км зони відчуження ЧАЕС. Наприклад, у рудих нориць частота участі в асинхронному розщепленні центромерних районів метацентричних хромосом була 57,8%, у контролі – 4%. Отже, єдина пара метацентричних хромосом у рудих нориць – високочутливий і зручний для застосування у біоіндикації параметр. У нориці сибірської (рівень забруднення місця вилову 400–700 Ки/км^2) було виявлено підвищену частоту участі в асинхронному розщепленні центромерних районів хроматид у хромосомах № 10 та 14.

Зазначимо, що застосування цього показника без урахування особливостей морфології хромосом каріотипу біоіндикаторного виду може бути малоінформативним [12]. Наприклад, у нориці рудої загальний аналіз метафазних пластинок виявив 9,7% метафаз з асинхронним розщепленням хромосом (контроль – 5,4%). У нориці звичайної переважали метафази, у яких в АРЦРХ залучено більше однієї хромосоми. АРЦРХ виявлені у всіх групах хромосом, і розподіл участі хромосом у цій аномалії не відрізнявся від їхнього відсоткового внеску в каріотип. Оскільки для виду описано поліморфізм за кількістю плечей хромосом [9], можна припустити, що в геномі *M. arvalis* центромерні райони є найменш стабільними ділянками хромосом, як, очевидно, і в соматичних клітинах.

Частота клітин кісткового мозку з мікроядрами. Загалом мікроядерний тест є повнішою характеристикою дестабілізації хромосомного апарату, ніж

хромосомні аберації, оскільки мікроядра виникають не тільки внаслідок утворення хромосомних і хроматидних фрагментів, а й унаслідок відставання цілих хромосом (анеуплоїдія). Проте й у цьому випадку частина ушкоджень може бути зумовлена не прямою дією генотоксину на ядро, а зміною систем загального внутрішньоклітинного метаболізму, що контролюють, наприклад, функції веретена поділу. Спрощення підрахунку клітин із мікроядрами – ще одна перевага мікроядерного аналізу.

Контрольний рівень частоти клітин кісткового мозку з МЯ для мишоподібних гризунів відповідає 2,7–5,6‰ [19]. Під час використання мікроядерного тесту було виявлено видові особливості у відповіді на генотоксичний вплив. У нориці сибірської із більш забруднених нуклідами територій рівень клітин кісткового мозку з МЯ вірогідно перевищував контроль тільки в перший рік після аварії (1987), у нориці звичайної – і в 1987, і в 1988, і в 1996–1999 роки [1, 10, 11].

У звичайних нориць кількість клітин із МЯ виявилася тісніше пов'язаною з рівнем радіонуклідного забруднення регіону вилову, ніж ХА, виявлено тісний зв'язок між частотою анеуплоїдних клітин і МЯ. Коефіцієнт кореляції між частотою клітин з анеуплоїдією і МЯ становив – 0,68 ($P<0,05$). Можливо, виражений внесок у МЯ втрат хромосом пов'язаний із порушеннями центромерних районів хромосом, оскільки дослідженнями каріограм нориці звичайної виявлено хроматидні розриви у ділянці центромери, а також зміни морфології центромерних районів (перехрести хроматид у ділянці центромерних районів, деформації цих ділянок). В однієї з тварин виявлено 37% метафаз із такими порушеннями.

Здебільшого такі дефекти спостерігали в великих мета- і субметацентричних хромосомах [12]. Відомо, що *Microtus arvalis* притаманна каріотипна нестабільність в ареалі [9]. Порівняльний каріотипний аналіз і молекулярно-генетичні дослідження мітохондріальної ДНК нориць (*Microtus*) свідчать, що еволюційно каріотип *M. arvalis* сформувався значно пізніше, ніж у нориці сибірської та нориці рудої [21]. Порушення центромерних районів хромосом і зв'язок МЯ з анеуплоїдією дають змогу припустити, що підвищена нестабільність центромерних районів хромосом є видовою особливістю *M. arvalis* [12].

Частота поліхроматофільних еритроцитів із мікроядрами в периферійній крові. Мікроядерний тест в еритроцитах широко використовують для оцінки генотоксичної дії різних чинників. Природа появи мікроядер в еритроцитах може бути такою, як у лімфоцитах. Крім того, появу мікроядер в еритроцитах можуть зумовити дефекти ядерної оболонки в еритробласті, завдяки яким фрагменти ядра іноді затримуються в цитоплазмі під час виштовхування ядра в процесі дозрівання еритробластів. Хибним у цьому методі може бути те, що наявність мікроядер буває більше зумовлена балансом між поліхроматофільними (юними) і зрілими (нормохромними) формами еритроцитів, ніж самим генотоксичним ефектом.

У кістковому мозку миші еритробласти проходять шість–сім поділів з тривалістю одного клітинного циклу близько 10 год. Приблизно через 10 год після останнього мітозу завершується виштовхування основного ядра, а поліхроматофільні еритроцити залишаються в кістковому мозку ще протягом 10 год. Індуковані мутагеном мікроядра з'являються в поліхроматофільних еритроцитах не пізніше, ніж через 10 год. У разі дії деяких хімічних речовин мікроядра можуть з'являтися значно пізніше цього терміну, тобто вихід ядра може затримуватися [20].

Зміна темпів клітинного поділу, загибель зрілих і юних форм, прискорений вихід зрілих форм у кровоплин також суттєво впливають на результат, змінюючи співвідношення між кількістю юних і зрілих форм. Наявність мікроядер у поліхроматофільних еритроцитах може відображати підвищену кількість малодиференційованих клітин більше, ніж наявність справжніх хромосомних мутацій. Отже, за допомогою цього методу виявляють цитотоксичний ефект (зміна темпів клітинного поділу, швидкість загибелі зрілих форм, швидкість дозрівання від поліхроматофільних до нормохромних еритроцитів), а не генотоксичний.

Для біоіндикації територій, забруднених радіонуклідами, кількість поліхроматофільних еритроцитів із мікроядрами є менш чутливою характеристикою порівнянно з кількістю клітин кісткового мозку з мікроядрами. Про це свідчать дані І. Смолича. Під час дослідження ефектів хронічного і гострого опромінення у нориці рудої, що живе у районах, забруднених внаслідок аварії на ЧАЕС, виявлено зв'язок між кількістю клітин кісткового мозку з МЯ та рівнем забруднення ділянки вилову. Між кількістю поліхроматофільних еритроцитів із мікроядрами і рівнем радіонуклідного забруднення зв’язку не виявлено. Рівень нормохроматофільних еритроцитів із мікроядрами становив 0,1–0,27‰ [18].

Отже, для ефективного використання мишоподібних гризунів з метою біоіндикації генотоксичності навколишнього середовища необхідно враховувати, що відповідь на генотоксичність відбувається через видову специфіку. Це – чутливість організації каріотипу виду в цілому і залученість у відповідь на генотоксичні чинники окремих хромосом. Суттєву роль в інтерпретації результатів відіграють: морфологія окремих хромосом щодо морфології каріотипу загалом, наявність хромосомних рас і конститутивних хромосомних аномалій у популяції.

---

1. *Башлыкова Л. А.* Частота микроядер в клетках костного мозга мышевидных грызунов в условиях радиоактивного загрязнения // Экол. последствия радиоактивных загрязнений среды. Сыктывкар. 1981. С. 58–64.
2. *Бородкин П. А., Сусликов В. И., Башлыкова Л. А.* Цитогенетическое исследование микропопуляции полевки-экономки (*Microtus oeconomus* Pall.), обитающих в различных радиоэкологических условиях // Радиобиология. 1988. № 28 (3). С. 356–361.
3. *Гилева Э. А., Большакова В. Н., Косарева Н. Л., Габитова А. Т.* Частота хромосомных нарушений у синантропных мышей домовых мышей как показатель генотоксического эффекта загрязнений среды // Докл. РАН. 1992. Т. 322. № 5. С. 1058–1061.

4. *Гилева Э. А., Косарева Н. Л., Любашевский Н. Л., Бахтиярова М. Ф.* Изменчивость частоты хромосомных нарушений, индуцированных антропогенными поллютантами, у домовых мышей из Гиссарской долины // Экология. 1993. № 1. С. 62–70.
5. *Гилева Э. А., Любашевский Н. М., Стариченко В. И., Чибиряк М. В. и др.* Наследуемая хромосомная нестабильность у обыкновенной полевки *(Microtus arvalis)* из района Кыштымской ядерной аварии – факт или гипотеза? // Генетика. 1996. Т. 32. № 1. С. 114–119.
6. *Дмитриев С. Г.* Оценка цитогенетического гомеостаза в природных популяциях мелких мышевидных грызунов в районе нижней (г. Астрахань) и средней (г. Чапаевск) Волги // Генетика. 1997. Т. 33. № 11. С. 1589–1592.
7. *Дмитриев С. Г.* Цитогенетическая нестабильность у трех видов грызунов в районе химического предприятия на севере России // Экология. 1997. № 6. С. 447–451.
8. *Дубинин Н. П., Шевченко В. А., Алексенок А. Я., и др.* О генетических процессах в популяциях, подвергающихся хроническому воздействию ионизирующей радиации // Успехи совр. генетики. М.: Наука, 1972. С. 170–205.
9. *Загороднюк И. В.* Кариотипическая изменчивость 46-хромосомных форм полевок группы *Microtus arvalis* (Rodentia): таксономическая оценка // Вестн. зоологии. 1991. Т. 25. № 1. С. 36–45.
10. *Зайнуллин В. Г., Ракин А. О., Таскаев А. И.* Динамика частоты цитогенетических нарушений в микропопуляциях мышевидных грызунов, обитающих в районе аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т. 34. Вып. 6. С. 852–857.
11. *Костенко С. А., Глазко Т. Т., Бунтова Е. Г.* Видоспецифичность дестабилизации кариотипа в условиях радионуклидного загрязнения (ЧАЭС) у полевок *Microtus oeconomus, Microtus arvalis, Clethrionomys glareolus* // Цитологія та генетика. 2001. Т. 35, № 2. С. 11–18.
12. *Костенко С. О., Глазко Т. Т, Бунтова О. Г.* Цитогенетичні аномалії у трьох видів нориць (Arvicolidae) в умовах зони відчуження Чорнобильської АЕС // Вісн. Луган. держ. пед. ун-ту ім. Тараса Шевченка. 2002. № 1 (січень). С. 67–75.
13. *Крысанов Е. Ю., Дмитриев С. Г.* Цитогенетический подход // Биотест: интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов / Под ред. В. М. Захарова, Д. М. Кларка. М., 1993. 42 с.
14. *Крысанов Е. Ю., Дмитриев С. Г., Наджафова Р. С.* Цитогенетический гомеостаз // Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье среды / Под ред. В. М. Захарова, Е. Ю. Крысанова. М.: Наука, 1996. С. 77–84.
15. *Крюков В. И., Толстой В. А., Долгополова Г. В.* Влияние химического загрязнения экосистем долины реки Вахш на частоту хромосомных нарушений у грызунов // Экология. 1993. № 1. С. 92–95.
16. *Крюков В. И., Толстой В. А., Долгополова Г. В., Каневская Р. Т.* Влияние химического загрязнения экосистем долины реки Сурхандарьи на частоту хромосомных нарушений у грызунов // Экология. 1995. № 2. С. 169–171.
17. *Лекявичус Р. К.* Химический мутагенез и загрязнение окружающей среды. Вильнюс: Моклас, 1983. 223 с.
18. *Смолич И. И.* Мутагенные эффекты хронического и острого облучения у *Clethrionomys glareolus* (Schreber): Автореф. дис. … канд. биол. наук. Минск, 2001. 22 с.
19. *Cea G.F., Etcheberry K. F., Dulout F. N.* Induction of micronuclei in mouse bone-marrow cells by the flavonoid 5,3',4'-trihydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-flavone (THTMF) // Mutat. Res. 1983. Vol. 119, № 3. P. 339–342.

20. *Jenssen D, Beije B, Ramel C.* Mutagenicity testing on chinese hamster V79 cells treated in the in vitro liver perfusion system. Comparative investigation of different in vitro metabolising systems with dimethylnitrosamine and benzo[a]pyrene // Chem. Biol. Interact. 1979. Vol. 27. № 1. P. 27–39.
21. *Mazurok N. A., Rubtsova N. V., Isaenko A. A., et al.* Comparative chromosome and mitochondrial DNA analyses and phylogenetic relationships within common voles (*Microtus*, Arvicolidae) // Chromosome Res. 2001. Vol. 9. № 2. P. 107–120.
22. *McBee K., Bickham J. M., Brown K. W., Donelly K. C.* Chromosomal aberrations in native small mammals (*Peromysus leucopus* and *Sigmodon hispidus*) at petrochemical waste disposal site: I. Standard karyology // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1987. Vol. 16. P. 681–688.
23. *Parada R., Jaszczak K.* A cytogenetic study of cows from a highly industrial or an agricultural region // Mutat. Res. 1993. Vol. 300, № 3-4. P. 259–263.

USE OF CYTOGENETIC PARAMETERS OF SOME SMALL RODENTS FOR BIOINDICATION OF POLLUTION AREAS

S. Kostenko, T. Glazko

Institute of agroecology and biotechnology, Ukr. AAS,
Metrologichna str., 12, 03143, Kyiv, Ukraine,
e-mail: glazko@biotech.kiev.ua

The article deals with problems of bioindication on the pollution territory utilizing small rodents. It contains useful information about cytogenetic indexes of *Clethrionomys glareolus*, *Microtus oeconomus*, *M. arvalis*, that lived on the pollution territories and under control conditions. The answer for genotoxicity is specific for species and includes sensibility of whole karyotype and separate chromosomes. For interpretation of results, the major role may be playing the morphology of separate chromosome, presence of chromosome race and constitutive chromosome abnormality in populations.

Key words: low-dose ionizing irradiation, chromosome aberrations, micronucleus, cytogenetic variability, voles, Arvicolidae.

Стаття надійшла до редколегії 06.09.2002
Прийнята до друку 15.09.2002