

УДК 575.113.1

## Разнообразие меж- и внутривидовых мутационных спектров у некоторых видов мышевидных грызунов

Оксана Ковалева, Елена Бурдо, Надежда Кобозева, Татьяна Глазко

**Різноманіття між- і внутрішньовидових мутаційних спектрів у деяких видів мишоподібних гризунів.** — Ковалева О., Бурдо О., Кобозева Н., Глазко Т. — Виконано порівняльний аналіз спонтанного мутагенезу в клітинах кісткового мозку у видів-двійників *Microtus arvalis* та *Microtus rossiaemerdionalis* і лабораторних ліній мишей BALB/c і C57Bl/6j. Показано незалежне формування різних типів цитогенетичних аномалій в спонтанних мутаційних спектрах клітин кісткового мозку: асинхронне розщеплення центромерних районів хромосом і центричні злиття асоційовані з морфологією аутосом, хромосомні аберації і анеуплоїдія залежать від генотипової диференціації тварин, а поліплоїдія — від сезону дослідження. Складність спонтанних мутаційних спектрів і факторів, які беруть участь у контролі формування різних типів цитогенетичних аномалій необхідно враховувати при використанні дрібних мишоподібних гризунів з метою біоіндикації генотоксичних забруднень.

**Ключові слова:** біоіндикація, види-близнюки, цитогенетичні аномалії, спонтанні мутаційні спектри.

**Адреса:** Інститут агроекології УААН, вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна.

E-mail: glazko@biotech.relc.com.

**Diversity of inter- and intraspecies mutation spectra in some species of mice-like rodents.** — Kovalova O., Burdo O., Kobozeva N., Glazko T. — Comparative analysis of spontaneous mutagenesis in the bone marrow cells in sibling species — *Microtus arvalis*, *Microtus rossiaemerdionalis* and laboratory line mice — BALB/c, C57Bl/6j was carry out. We show a independent formation of the different types of cytogenetic anomalies in spontaneous mutation specters. For example: asynchronous separation of chromosomes and inter-chromosome fusion are associated with morphology of autosome, chromosome aberrations and aneuploidy are depend from genotypical differentiation of animal, and polyploidy — from season of investigation. The complication of both spontaneous mutation specters and factors were participated in the control of formation of various cytogenetic anomalies are necessary take into consideration at the use of small-sized rodent species for the bioindication of genotoxicall pollutions.

**Key words:** bioindication, sibling species, cytogenetic anomalies, spontaneous mutation specters.

**Address:** Institute of Agroecology, UAAS, 12 Metrologichna str., Kyiv, 03143, Ukraine.

E-mail: glazko@biotech.relc.com.

### Введение

Цитогенетические исследования соматических клеток у мышевидных грызунов (*Muriformes*) начались еще с середины XX века. Использование их в качестве модельных объектов при оценке генетической опасности для населения загрязненных мутагенами территорий рекомендовано рядом авторов (Bruisick, 1987, Бочков, 1989, Монахов, 2000). Очевидным преимуществом грызунов является быстрая смена поколений. Это позволяет оценивать отдаленные последствия генотоксических эффектов в потомстве, что особенно важно для прогнозирования последствий для хромосомного аппарата потомства тех людей, которые подвергаются влиянию мутагенов (Монахов, 1985).

Несмотря на то, что цитогенетический мониторинг с помощью диких мелких грызунов разных видов широко используется для изучения мутагенного потенциала среды (Гилева, 1997), размах внутривидовой изменчивости до сих пор остается недостаточно исследованным. В то же время возможные межвидовые и внутривидовые особенности спонтанного мутагенеза могут существенно

усложнять интерпретацию результатов биоиндикации генотоксического загрязнения среды, выполняемой с использованием разных видов мелких мышевидных грызунов.

Информацию о размахе внутривидовой изменчивости по цитогенетическим характеристикам, связанной с генотипической компонентой, можно получить на лабораторных линиях мышей. Вклад в спектры спонтанного мутагенеза межвидовых отличий по количеству и морфологии хромосом в кариотипе может быть оценен при сравнении видов-близнецов с перекрывающимся ареалом. Поэтому в задачи настоящей работы входил сравнительный анализ спонтанного мутагенеза в клетках костного мозга у двух видов-двойников *Microtus arvalis* и *Microtus rossiaemeridionalis* и лабораторных линий мышей BALB/c и C57Bl/6j.

## Материалы и методы

Выполнен цитогенетический анализ клеток костного мозга у мышей *Microtus arvalis*, отловленных в Киевской области, и у *Microtus rossiaemeridionalis*, выловленных в Харьковской области. Рассматривались также клетки костного мозга лабораторных линий мышей BALB/c и C57Bl/6j, образцы которых были получены из вивария Института молекулярной биологии и генетики НАНУ (1994 г. и 2003 г. — объединенные данные).

Препараты клеток костного мозга готовили общепринятым способом (без применения колхицина): из бедренных костей мышей вымывали гипотоническим раствором KCl (0,54 %) костный мозг, клетки суспензировали и инкубировали в этом растворе при 37 °С в течение 20 минут, затем фиксировали смесью метилового спирта и уксусной кислоты (3:1), далее готовили препараты и окрашивали их красителем Гимза (Merck, Германия). Количество двуядерных лимфоцитов и одноядерных лимфоцитов с микроядрами подсчитывали на тех же препаратах в лимфоцитах, сохранивших цитоплазму, по стандартной методике.

Для анализа цитогенетической изменчивости рассматривали следующие характеристики дестабилизации генетического аппарата клеток: анеуплоидия, рассчитанная в двух вариантах (A1, с числом хромосом  $\pm 6$  к диплоидному числу и A2, с числом хромосом  $\pm 1$  к диплоидному числу каждого вида), полиплоидия (ПП), хромосомные aberrации (ХА) (хромосомные, хроматидные разрывы, фрагменты, кольцевые хромосомы), асинхронность расщепления центромерных районов хромосом (АРЦХ), межхромосомные ассоциации по типу робертсоновских транслокаций (РБ). Количество митозов (МИ) и частоту встречаемости двуядерных лимфоцитов (ДЛ) рассчитывали на 1000 клеток, микроядра в одноядерных лимфоцитах (ЛМЯ) — по числу лимфоцитов с микроядрами на 1000 одноядерных лимфоцитов.

Статистическую достоверность различий по частотам встречаемости цитогенетическим аномалиям между группами животных оценивали по критерию Стьюдента ( $t_s$ ).

## Межвидовые отличия

Виды полевков отличались между собой по количеству акроцентрических и метацентрических хромосом: кариотип *Microtus arvalis* представлен  $2n=46$ ,  $Fna=84$  и *Microtus rossiaemeridionalis* —  $2n=54$ ,  $Fna=54$ .

При сравнении этих видов-двойников по 9 цитогенетическим параметрам у *Microtus rossiaemeridionalis* обнаружена статистически достоверно более высокая частота встречаемости метафаз с центрическими слияниями акроцентрических хромосом (РБ) и полиплоидных клеток (ПП) ( $P < 0,01$  для обеих характеристик) по сравнению с *Microtus arvalis*, а также тенденция к относительно увеличенной частоте встречаемости анеуплоидных клеток (A2) и одноядерных лейкоцитов с микроядрами (ЛМЯ) (табл. 1).

Наблюдаемые частые центрические слияния по типу робертсоновских транслокаций могут объясняться преимущественным наличием в кариотипе акроцентрических аутосом (рис. 1). Принято считать, что слияние акроцентрических хромосом является одним из основных путей эволюции кариотипа у млекопитающих (Воронцов, 1999). Можно ожидать, что наиболее древним среди близкородственных видов является тот, у которого преобладают акроцентрические аутосомы.

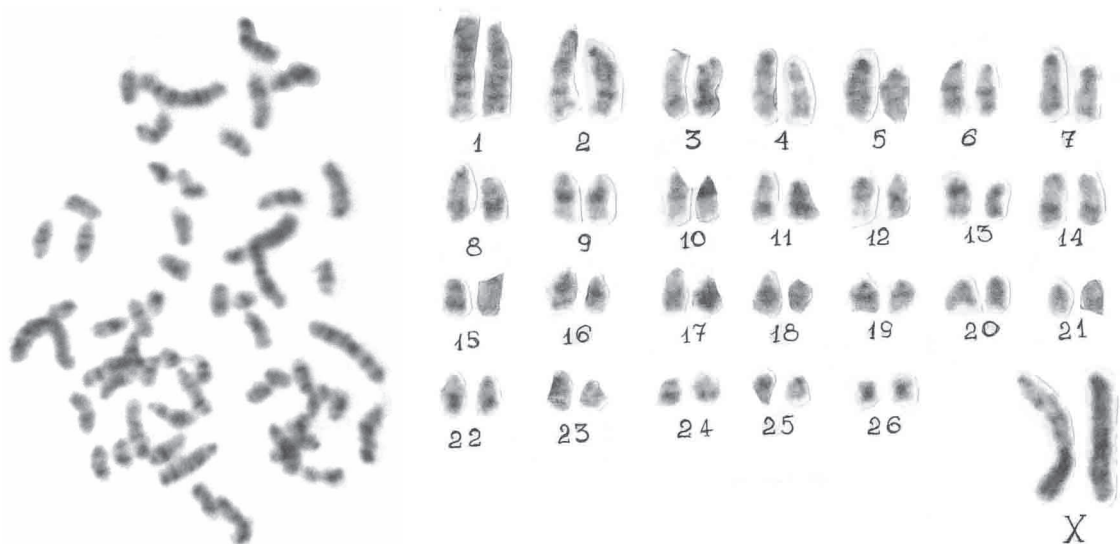


Рис. 1. Кариотип *Microtus rossiaemeridionalis* представлен в основном акроцентрическими хромосомами

У *Microtus arvalis*, у которых в кариотипе аутосомы в основном представлены субметацентриками и метацентриками (рис. 2), статистически достоверно чаще по сравнению с *Microtus rossiaemeridionalis* встречались клетки с асинхронным расщеплением центромерных районов (АРЦХ —  $P < 0,05$ ) (табл. 1). В то же время, по общему количеству анеуплоидных клеток виды-близнецы статистически достоверно не отличались друг от друга (см. табл. 1), несмотря на то, что АРЦХ может быть одним из возможных механизмов возникновения анеуплоидии (Vig, 1983).

По-видимому, это может объясняться различными механизмами возникновения анеуплоидии. Интересно отметить, что виды-близнецы существенно отличаются друг от друга по частотам встречаемости полиплоидных клеток и двуядерных лимфоцитов (табл. 1). Ранее нами было показано, что увеличение частот полиплоидных клеток типично для некоторых линий мышей в осенне-зимний период (Глазко, 2003). Поскольку образцы костного мозга были получены у европейской полевки в зимний период, а у обыкновенной полевки — в летний, не исключено, что отличия между ними по доле полиплоидных клеток и двуядерных лимфоцитов обусловлено сезонной изменчивостью по этим характеристикам.



Рис. 1. Кариотип *Microtus arvalis* ( $2n=46$ ,  $Fna=84$ ) представлен суб- и метацентрическими хромосомами

Таблица 1. Частоты цитогенетических характеристик в клетках костного мозга у видов-двойников полевок *Microtus arvalis* и *Microtus rossiaemeridionalis* и у лабораторных мышей линий BALB/c и C57Bl/6j

Показатель	<i>Microtus arvalis</i> июль	<i>M. rossiaemeridionalis</i> февраль	Линия BALB/c январь-апрель, (2–3 мес.)	Линия C57Bl/6j март-апрель, (2–3 мес.)
Количество животных	15	4 (9)	10	10
Количество метафаз	948	227	679	630
Метафаз 2N=40 (%)	—	51,8±7,4	—	—
Полиплоидия (%)	0,9±0,5*	11,8±3,4*	1,7±0,8	2,7±0,8
Доля метафаз (%) с				
А-I	44,4±5,1	47,5±4,8	31,1±4,4	24,4±4,5
А-II	8,6±2,8	13,9±3,5	9,7±2,6*	2,5±1,0*
ХА	2,5±0,6	3,2±0,8	5,1±1,1*	1,8±0,6*
Rb	0,1±0,5*	5,8±1,8*	7,8±1,1*	4,3±1,0*
АРЦХ	16,5±4,9**	2,2±1,1**	4,2±1,2*	1,3±0,7*
Частота на 1000 одноядерных лейкоцитов (%)				
ЛМЯ	3,0±0,4	5,0±1,5	6,6±1,0	4,7±0,7
ДЯЛ	5,0±0,8	13,6±4,6	5,7±0,7	5,1±0,8
МИТОЗОВ	4,5±0,9	6,0±2,0	4,6±1,5	5,2±1,3

\* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$ ; \*\*\* —  $P < 0,001$ .

В общем, основные отличия между видами-близнецами по спонтанным мутационным спектрам наблюдались по частотам встречаемости тех цитогенетических аномалий, формирование которых может зависеть от морфологии хромосом (асинхронность расщепления центромерных районов, центрические слияния).

### Внутривидовая изменчивость

Внутривидовую изменчивость по цитогенетическим аномалиям оценивали у лабораторных мышей линий BALB/c и C57Bl/6j (табл. 1, справа), которые относятся к тому же надвиду, что и домовые мыши (*Mus musculus*) ( $2n=40$ ,  $Fna=40$ ) и имеют одинаковый кариотип. Известно, что повышенная частота встречаемости метафаз с хромосомными аберрациями (ХА), является линейно специфичной характеристикой спонтанных мутационных спектров делящихся клеток мышей линии BALB/c, которую связывают с относительно сниженной активностью ферментов репарации ДНК (Sato et al., 1995). По данным из литературы, у этой линии обнаруживается около 19,9 % метафаз с ХА среди гепатоцитов (Корогодина, 1978) и 5 % — среди клеток костного мозга (Sato et al., 1995). Для выяснения внутривидового размаха изменчивости спонтанных мутационных спектров, в наших исследованиях проведен сравнительный анализ комплекса цитогенетических характеристик в клетках костного мозга у двух линий: BALB/c и C57Bl/6j.

Мыши линии BALB/c отличались от мышей линии C57Bl/6j статистически достоверно большей частотой метафаз с ХА, РБ, АРЦХ и анеуплоидных клеток (А-2) —  $P < 0,05$  для всех характеристик. Ранее нами показано, что анеуплоидия для животных линии BALB/c является нестабильной характеристикой и при влиянии низкодозового воздействия радионуклидов увеличивается (Глазко, Ковалева, 1998).

Очевидно, что поскольку у обеих линий кариотипы содержат одинаковое число акроцентрических хромосом, а линия BALB/c сохраняет повышенный фоновый уровень соматического мутагенеза, перечисленные выше отличия между линиями зависят не от морфологии хромосом, а от генетических особенностей самих животных.

Таким образом, сравнение частот встречаемости цитогенетических аномалий у представителей разных лабораторных линий мышей и видов-близнецов в спонтанных мутационных спектрах, позволяют выделить некоторые из них, имеющие непосредственную связь с морфологией хромосом.

Так, для видов с преобладанием в кариотипе суб- и метацентрических хромосом (*Microtus arvalis*) характерна высокая частота АРЦХ (16,5±4,9 %). Такая же высокая частота АРЦХ обнаружена и у *Microtus oeconomus* (12,7±3,3 %) в наших ранних исследованиях (Глазко и др., 2003). Для этих видов характерна также низкая частота РБ: у *Microtus arvalis* — 0,1±0,5 %, и отсутствие РБ у *Microtus oeconomus*.

## Заклучение

На основании полученных данных можно сделать следующее заключение.

Различные типы цитогенетических аномалий в спонтанных мутационных спектрах клеток костного мозга у исследованных мелких мышевидных грызунов формируются независимо друг от друга. Возникновение некоторых типов цитогенетических аномалий ассоциировано с морфологией аутосом. Так, для видов с преимущественно мета- и субметацентрическими хромосомами в кариотипах характерна повышенная частота встречаемости метафаз с асинхронным расщеплением центромерных районов хромосом и низкая частота центрических слияний.

Изменчивость частот встречаемости таких аномалий, как хромосомные aberrации, анеуплоидия в существенной степени зависит от генотипической дифференциации животных в пределах одного и того же вида. По-видимому, доля полиплоидных клеток может варьировать в зависимости от сезона исследований. Очевидно, что сложность спонтанных мутационных спектров и факторов, участвующих в контроле формирования различных типов цитогенетических аномалий необходимо учитывать при использовании мелких мышевидных грызунов в целях биоиндикации генотоксических загрязнений.

## Литература

- Бочков Н. П., Чеботарев А. Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. — Москва: Медицина, 1989. — 270 с.
- Воронцов Н. Н. Развитие эволюционных идей в биологии. — Москва: Прогресс-Традиция, 1999. — 640 с.
- Гилева Э. А. Эколого-генетический мониторинг с помощью грызунов (уральский опыт). — Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 1997. — 105 с.
- Глазко Т. Т., Кобозева Н. А., Ковалева О. А., Бунтова Е. Г. Селекция на радиорезистентность у мелких мышевидных грызунов в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС // Агроекологічний журнал. — 2003. — № 4. — С. 40–45.
- Глазко Т. Т., Ковальова О. А., Придатко О. Є. Мінливість різних характеристик дестабілізації кариотипу у зв'язку з віком, сезоном дослідження та в умовах хронічного іонізуючого опромінення у мишей ліній BALB/c, C57BL/6 та CC57W/Mv // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. — Київ: Логос, 2001. — Том 4. — С. 140–145.
- Глазко Т. Т., Ковалева О. А., Сафонова Н. А. и др. Цитогенетическая изменчивость у разных линий мышей в 30 км зоне Чернобыльской АЭС // Збірник наукових праць Інституту землеробства УААН. — Київ, 1998. — Випуск 1. — С. 294–301.
- Корогодина Ю. В., Лильн И. Г. Мутабельность соматических клеток мышей разных линий. Сообщение II // Цитология и генетика. — 1978. — № 12. — С. 34–136.
- Монахов А. С. Закономерности радиационного мутагенеза на клеточном уровне // Проблемы радиационной генетики на рубеже веков: Междунар. конф. — Москва, 2000. — С. 159.
- Яблоков А. В., Остроумов С. А. Уровни охраны живой природы. — Москва: Наука, 1985. — 175 с.
- Bruisick D. Principles of genetic toxicology. 2nd ed. — New York, London: Plenum Press, 1987. — 284 p.
- Sato S., Taketomi M., Nakajima M. et al. Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains // Mutat. Res. — 1995. — Vol. 338. — P. 51–57.
- Vig B. K. Sequence of centromere separation: occurrence, possible, significance, and control // Cancer Genet. Cytogenet. — 1983. — Vol. 8, № 3. — P. 249–274.

Надійшло до редакції: 24 листопада 2005 р.