

УДК 636.1:575

Джус П.П., аспірантка, Костенко С.О., к.б.н., Супрун І.О., к.с.-г.н. ©
(E-mail: cvic_ua@mai.ru)

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

МІЖПОРОДНА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ КОНЕЙ ЗА ЦИТОГЕНЕТИЧНИМИ ПАРАМЕТРАМИ

Проведено цитогенетичний аналіз тимчасових культур лімфоцитів периферичної крові коней трьох порід. Виявлено міжпородні відмінності за окремими цитогенетичними параметрами. У кобил новоолександрівської вагозної породи вірогідно вищими були частоти ЛМЯ, АП, МІ і відсоток АРЦРХ порівняно із кіньми української верхової та гошитинської породи. У тварин української верхової породи відмічено найвищий відсоток анеуплоїдних клітин. Коні породи гошитин характеризувалися найнижчим рівнем кількісних і структурних порушень каріотипу серед досліджених порід.

Ключові слова: кінь, порода, цитогенетичні параметри, хромосомні аберації, мікродра.

У конярстві, як і в інших галузях тваринництва України, пріоритетним є забезпечення належного рівня продуктивних та відтворних якостей тварин. Належно профінансовані селекційні програми, системний ветеринарний нагляд та індивідуальний підхід при розведенні і утриманні коней не завжди забезпечують очікуваний результат. Тому, актуальними, на сьогодні, можна вважати комплексні дослідження генетики коней в розрізі їх породної приналежності. Адже, генетичний гомеостаз організму є невід'ємною запорукою його нормального росту, розвитку, функціонування і відтворення. Дестабілізація геному соматичних клітин, що виходить за рамки рівня спонтанного мутагенезу, слугує індикатором наявності мутагенного впливу факторів різної природи на тварин [5].

Порушення генетичних структур генеративних клітин організму призводить до зниження репродуктивних функцій, аномальних вагітностей та передачі нащадкам конститутивних змін каріотипу несумісних з життям. Оскільки коні моноплідні тварини, то це негативно відображається на загальній економічній ефективності їх утримання.

Серед усіх видів сільськогосподарських тварин коні є найменш вивченими за рівнем спонтанної соматичної мінливості та спектром хромосомних порушень в умовах дії мутагенних чинників. Це обумовлено цитологічними особливостями клітин їх крові, через які досить складно отримати високі значення мітотичного індексу лімфоцитів при культивуванні крові *in vitro* [1].

Тому для розширення інформаційної бази з питань цитогенетики сільськогосподарських тварин **метою** нашої роботи було вивчення соматичної мінливості клітин крові коней трьох порід.

Матеріали і методи. Кров відбирали з яремної вени у кобил новоолександрівської вагозної породи (n=11) (Дібрівський кінний завод №62

Полтавська обл.), коней голштинської ($n=5$) і української верхової ($n=5$) (Київський державний іподром) порід. Від кожної тварини проби крові культивували в трьох повторах за стандартною методикою [6] з певними модифікаціями. В першому повторі в якості стимулятора росту клітин використовували фітогемаглютинін (ФГА Р в робочій концентрації 0,01 мг/мл. В другому – ФГА L концентрацією 0,01мг/мл. В третьому повторі – ФГА L 0,001 мг/мл. Використані реактиви вироблені Sigma, США.

На цитогенетичних препаратах підраховували кількість лімфоцитів з мікроядрами (ЛМЯ), двоядерних (ДЯ), апоптозних клітин (АП) і мітотичний індекс (МІ). Від кожної тварини аналізували не менше 3000 клітин.

При дослідженні метафазних пластинок встановлювали відсоток хроматидних розривів (ХР) та хромосомних фрагментів (ХФ), а також відсоток анеуплоїдних (А, *рис.1.*) і поліплоїдних (ПП) клітин, асинхронність розщеплення центромерних районів хромосом (АРЦРХ, *рис.2.*). У кожній тварини аналізували не менше 30 метафазних пластинок. Для дослідження цитогенетичних препаратів тимчасових культур лімфоцитів використовували бінокулярний мікроскоп Carl Zeiss. Аналіз каріотипу здійснювали при збільшенні мікроскопа у 1000 разів.

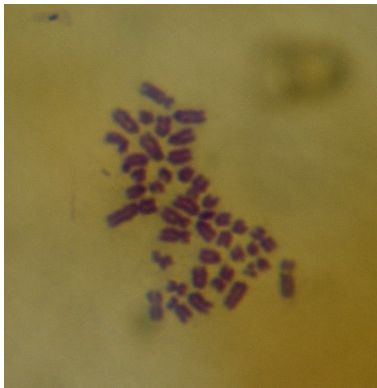


Рис.1. Анеуплоїдія ($2n=41$)

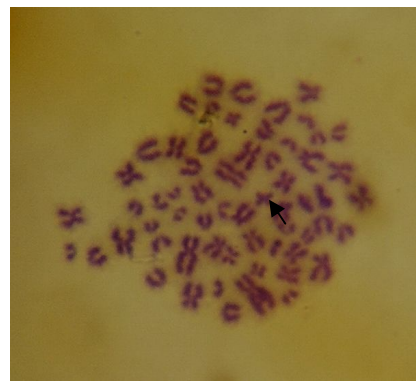


Рис. 2. АРЦРХ

Результати дослідження. Перед проведенням цитогенетичного аналізу було здійснено оцінку якості цитогенетичних препаратів тимчасових культур лімфоцитів периферійної крові коней, приготованих з підбором стимуляторів росту клітин *in vitro*. Найнижчим рівень мітотичної активності клітин виявився при використанні ФГА Р в робочій концентрації 0,01 мг/мл. Цитогенетичні препарати характеризувалися малою кількістю клітин і метафазних пластинок. При використанні ФГА L в концентрації 0,01 мг/мл спостерігали пригнічення росту клітин і відсутність метафаз. В концентрації 0,001 мг/мл ФГА L виявився найбільш ефективним. Цитогенетичні препарати характеризувалися великою кількістю клітин і метафаз. Метафази були гарної якості, з чітким розкидом хромосом. Ці препарати було використано для цитогенетичних досліджень.

Результати цитогенетичного аналізу тимчасових культур лімфоцитів коней досліджених порід представлено в таблиці 1.

Таблиця 1.

Цитогенетичні параметри клітин периферійної крові коней

№	Порода	n	На 1000 клітин, ‰			
			ЛМЯ	ДЯ	Апоптоз	МІ
1.	Новоолександрівський ваговоз	11	2,73±0,25	0,67±0,08 *	2,42±0,18	2,55±0,34
2.	Українська верхова	5	1,2±0,25 ***	1,0±0,21	1,47±0,25 **	1,6±1,9 **
3.	Голштинська	5	1,67±0,38 *	1,47±0,31 *	1,07±0,36 **	1,87±0,13

*** - при $p < 0,001$; ** - при $p < 0,01$; * - при $p < 0,05$

Згідно даних таблиці 1, у досліджених тварин за окремими цитогенетичними параметрами спостерігаються міжпородні відмінності. Так, у кобил новоолександрівської ваговозної породи відмічено статистично достовірно вищі значення частоти ЛМЯ порівняно із значенням аналогічного показника у коней української верхової (при $p < 0,001$) та голштинської (при $p < 0,05$) порід.

За частотою двоядерних лімфоцитів тварини породи голштин переважали коней української верхової породи та кобил новоолександрівської ваговозної породи при $p < 0,05$. Проте, кількість двоядерних клітин у них достовірно нижча за значення аналогічного показника у коней російської рисистої породи, досліджених Л.Ф. Стародуб. У рисаків частота ДЯ становила 4,6 ‰ [3].

Апоптозний індекс у коней породи новоолександрівський ваговоз був вірогідно вищим (при $p < 0,01$) порівняно із частотою апоптозних клітин у тварин породи чистокровна українська верхова і голштин. У кобил цієї ж породи відмічено також найвищий рівень мітотичної активності, що вірогідно переважає значення аналогічного показника (при $p < 0,01$) у коней української верхової породи. За результатами цитогенетичного аналізу, слід зауважити, що досліджені тварини не піддаються впливу мутагенних чинників, оскільки частота цитогенетичних порушень ядровмісних клітин їх периферійної крові не перевищує рівень спонтанного мутагенезу.

Для вивчення породних особливостей хромосомного поліморфізму коней досліджених порід проводили аналіз метафазних хромосом. Результати наведено в таблиці 2.

Як помітно із таблиці 2, кількісні зміни каріотипу у досліджених тварин представлені анеуплоїдією та поліплоїдією. Структурні порушення – асинхронним розходженням центромерних районів хромосом, хроматидними розривами і хромосомними фрагментами.

Відсоток анеуплоїдії у коней породи українська верхова вірогідно переважав значення аналогічного показника у тварин голштинської породи (при $p < 0,05$). Між частотою анеуплоїдії у кобил новоолександрівської ваговозної і тварин української верхової порід різниця недостовірна. Щодо поліплоїдії, то дещо вищі значення (2,62 ‰) відмічено у коней породи новоолександрівський ваговоз порівняно із українською верховою. У коней голштинської породи взагалі не виявлено поліплоїдних клітин. Одержані нами результати співпадають із даними В.В. Дзіцюк, яка також вказує на переважання кількості анеуплоїдних клітин у коней української верхової породи порівняно із ваговозними породами [2].

Таблиця 2.

Хромосомний поліморфізм коней досліджених порід

№	Порода	На 100 метафаз, %				
		А	ПП	АРЦРХ	ХР	ХФ
1.	Новоолександрівський ваговоз	3,95±0,73	2,62±0,74	7,36±1,11	2,93±0,82	2,68±0,86
2.	Українська верхова	6,3±0,96*	1,21±0,74	1,88±0,77***	3,23±1,02	3,88±1,21
3.	Голштинська	2,65±1,25*	0	1,25±0,77***	0	0

*** - при $p < 0,001$; * - при $p < 0,05$

За частотою асинхронного розходження центромерних районів хромосом кобили новоолександрівської ваговозної породи вірогідно переважали (при $p < 0,001$) коней інших досліджених порід. Це суперечить результатам досліджень В.В. Дзіцюк і А.В. Шельова, у яких коні ваговозного напрямку продуктивності мають найменший відсоток АРЦРХ серед усіх досліджених порід коней [2,7]. Пояснити такі розбіжності в результатах можна з огляду на те, що ми проводили цитогенетичне тестування кобил новоолександрівської ваговозної породи маточного поголів'я кумисної ферми в період їх лактації. З літератури нам відомо, що для корів саме молочного напрямку продуктивності характерний високий рівень АРЦРХ. Така особливість може бути пов'язана із фізіологічними особливостями і обмінними процесами в організмі самиць під час лактації [4].

При цитогенетичних дослідженнях не було виявлено міжпородних відмінностей за частотою хроматидних розривів і хромосомних фрагментів. У коней голштинської породи взагалі не спостерігалось структурних порушень каріотипу.

Отже, в ході цитогенетичного тестування коней трьох порід встановлено відсутність впливу факторів мутагенної природи на досліджених тварин. Рівень цитогенетичної нестабільності клітин їх периферійної крові відповідає параметрам спонтанної соматичної мінливості, притаманної ссавцям.

Висновки 1. Для одержання високої якості цитогенетичних препаратів тимчасових культур лімфоцитів периферичної крові коней найбільш ефективним є використання стимулятора росту клітин *in vitro* ФГА L в робочій концентрації 0,001 мг/мл.

2. Серед трьох досліджених порід коні породи новоолександрівської ваговозної характеризуються найвищою частотою лімфоцитів з мікроядрами, апоптозних клітин, мітотичного індексу та асинхронністю розходження центромерних районів хромосом.

3. Для коней української верхової породи характерний найвищий відсоток анеуплоїдії порівняно із значенням аналогічного показника у тварин порід новоолександрівський ваговоз і голштин.

4. У коней породи голштин відмічено найнижчий рівень кількісних і структурних порушень геному соматичних клітин порівняно із тваринами інших досліджених порід.

Література

1. Атлас ветеринарной гематологии / Риган В., Сандерс Т., Деникола Д. – М: Аквариум, 2000. – 136с.
2. Дзіцюк В. В. Хромосомний поліморфізм окремих видів і порід сільськогосподарських тварин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора с/г наук : спец. 03.00.15 « Генетика» / В. В. Дзіцюк. – Чубинське, 2009. – 30 с.
3. Костенко С.О. Цитогенетичне тестування коней російської рисистої породи / С.О. Костенко, Л.Ф. Стародуб // Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Розведення і генетика тварин». – К.: Аграрна наука. – 2009. – С. 187 – 192.
4. Стародуб Л. Цитогенетичний контроль продуктивності великої рогатої худоби / Л. Стародуб, С. Костенко // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2010. – №12. – С. 117-123.
5. Пикалова Л. В. Приминение цитогенетических методов исследования хромосом в радиологии / Л.В. Пикалова // Молекулярная биология. – Т. 9. – 2007. – С. 160 – 168.
6. Шельов А. В. Методика приготування метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові тварин / А. В. Шельов, В. В. Дзіцюк // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві : наук. зб. — К., 2005. — С. 210—213.
7. Шельов А. В. Цитогенетична оцінка племінних ресурсів сільськогосподарських тварин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня кандидата с.-г. наук : спец. 03.00.15 "Генетика" / А.В. Шельов – с. Чубинське, 2008. – 17 с.

Summary

The citogenetical analysis of limfocytes temporal cultures from the peripheral blood of three horse breed is done. The differences between breeds by the separate citogenetical parameters found out. Mares of novooleksandrivska heavy trout breed have certainly higher frequencies of limfocytes with micronucleus, apoptotic cells, mitotic indices and percent of asynchronous of centromere districts of chromosomes breaking up comparatively with the horse of Ukrainian riding and Holstein breeds. The greatest percent of aneuploid cells is marked in the Ukrainian riding breed. The horses of Holstein breed are characterized by the lowest level of quantitative and structural violations of karyotype among the investigational.

Keywords: *citogenetical analysis, citogenetical parameters of horses, micronucleus, chromosomes aberration.*

Рецензент – д.с.-г.н., проф. Щербатий З.Є.