

УДК 636.2:575.224.42

АССОЦИАЦИЯ РЕЦИПРОКНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ RCP (13; 26) (Q24; Q11) С УРОВНЕМ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

М. Л. Кочнева, доктор биологических наук, профессор

А. Н. Жиденова, инженер-аналитик

К. В. Жучаев, доктор биологических наук, профессор

Новосибирский государственный аграрный университет

E-mail: mlkochneva@nsau.edu.ru

Ключевые слова: реципрокная транслокация, соматическая хромосомная нестабильность, геномные мутации, хромосомные мутации, крупный рогатый скот

Реферат. В представленной работе изучена соматическая хромосомная нестабильность у фенотипически здоровых коров голштинизированной черно-пестрой породы, из числа которых одно животное являлось носителем реципрокной транслокации rcp (13; 26) (q24; q11). Выявлена повышенная частота хромосомных мутаций у носительницы транслокации в сравнении с полусибсами ($P < 0,05-0,01$) и сверстницами ($P < 0,05-0,001$). Так, частота фрагментов хромосом у транслоканта была выше в 3 раза и более, чем у контрольных групп животных ($P < 0,01$). Обнаружена тенденция к росту числа мультиабберрантных клеток, содержащих две и более хромосомных мутации у носительницы транслокации. Установлено, что наличие реципрокной транслокации может сопровождаться ростом числа клеток с триплоидным набором хромосом, что не является характерным для спонтанного мутагенеза. Анализ частоты анеуплоидных клеток у исследованных животных выявил превосходство групп сверстниц и полусибсов по этому показателю в сравнении с носительницей мутации ($P < 0,01$). Достоверные различия формировались главным образом за счёт повышенной частоты гипоплоидных клеток и, в частности, по частоте клеток с нехваткой одной хромосомы ($P < 0,01$). Высказано предположение, что у носительницы реципрокной транслокации отмечается сбой в репаративной системе повреждений ДНК, что не приводит к элиминации мутантных клеток.

Из числа нарушений кариотипа, зарегистрированных у крупного рогатого скота, можно выделить хромосомные aberrации и анеуплоидию по половым хромосомам [1]. Часто встречающиеся нарушения кариотипа представляют собой робертсоновские и реципрокные транслокации, часть из которых наследуются, а другие возникают de novo. Хромосомные мутации (aberrации, перестройки) представляют собой перемещения генетического материала, приводящие к изменению структуры хромосом. В основе всех этих мутаций лежат одиночные или множественные разрывы хромосом, вследствие чего создается возможность для утери и ошибочной рекомбинации фрагментов хромосом [2].

Различают сбалансированные и несбалансированные хромосомные перестройки. Несбалансированные хромосомные aberrации у крупного рогатого скота, как правило, не наносят весомый экономический ущерб отрасли животноводства [3], поскольку носители таких мутаций погибают на ранних стадиях развития или имеют существенные фенотипические дефекты, что является

основанием для выбраковки их из воспроизводства. В противовес несбалансированным мутациям сбалансированные, к которым, в частности, относятся транслокации, представляют существенную опасность в связи с тем, что их носители являются фенотипически нормальными, однако в половозрелом возрасте чаще всего у них наблюдается снижение фертильности [4, 5], а в отдельных случаях – стерильность [6–8].

Угнетение воспроизводительной функции носителей транслокаций связывают с различными нарушениями мейотического спаривания и расхождением хромосом. Наличие цепи или кольца квадριвалентов в диакинезе ведет к неравному расхождению и, как следствие, возрастает доля несбалансированных наборов хромосом в метафазе II мейоза.

Как правило, стабильные хромосомные мутации достаточно продолжительное время сохраняются в пуле клеток последующих поколений, что может приводить к канцерогенезу [9] или существенному повышению частоты нестабильности генома соматических клеток [10].

Следует отметить, что в отличие от хромосомных мутаций, происходящих на уровне геномных клеток и проявление которых возможно только в следующих поколениях, соматические мутации могут еще при жизни особи выступать маркерами пониженного иммунитета, различных заболеваний.

Целью нашего исследования было выявление ассоциаций реципрокной транслокации (13;26) (q24;q11) с уровнем соматической хромосомной нестабильности у крупного рогатого скота.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В популяции голштинизированной черно-пестрой породы крупного рогатого скота Новосибирской области была выявлена фенотипически нормальная корова – носительница реципрокной транслокации. Совместно с сотрудниками лаборатории сравнительной геномики Института молекулярной и клеточной биологии РАН была проведена дифференциальная окраска хромосом – носителей мутации [11, 12]. GTG-окрашивание выявило, с одной стороны, нетипичную хромосому, возникшую в результате реципрокной транслокации между хромосомами 13-й и 26-й, а с другой – значительно укороченную хромосому из 26-й пары, которая представляет собой продукт этой мутации.

За период хозяйственного использования от этой коровы было получено четыре фенотипически здоровых теленка (3 бычка и телочка). Третья стельность была прервана абортom. Следует отметить тот факт, что один из потомков (телочка), который был доступен для цитогенетического анали-

за, унаследовал мутацию от матери. К сожалению, кариотипический анализ других потомков не удалось осуществить по причине их выбытия из стада.

Проведено цитогенетическое исследование 17 коров-сверстниц, из числа которых 5 голов являлись полусибсами коровы – носительницы реципрокной транслокации. У каждого животного определяли частоту встречаемости метафазных пластинок с хромосомными (одиночные и парные фрагменты, разрывы в области центромеры) и геномными мутациями (полиплоидные, анеуплоидные клетки).

Статистическую достоверность различий частот встречаемости цитогенетических аномалий между группами животных оценивали с помощью χ^2 -преобразования критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведен анализ соматической хромосомной нестабильности у коровы с реципрокной транслокацией в сравнении с её полусибсами и сверстницами (табл. 1, 2).

Установлены достоверные различия по частоте хромосомных мутаций между группами животных (см. табл. 1). По всем показателям частота нарушений у носительницы транслокации была выше, чем у полусибсов ($P < 0,05-0,01$) и сверстниц ($P < 0,05-0,001$). Исключение составила частота разрывов в области центромеры хромосом, однако наблюдается тенденция к росту их числа у носительницы мутации. В целом уровень клеток с хромосомными мутациями у транслоканта был выше в 2,3 раза, чем у полусибсов и сверстниц ($P < 0,05$). По частоте хромосомных мутаций но-

Таблица 1

Частота соматических хромосомных мутаций у носительницы транслокации, её полусибсов и сверстниц, %

Показатели	Транслокант	Полусибсы		Сверстницы	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	lim	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	lim
Клетки с хромосомными мутациями	$8,33 \pm 2,52$	$3,65 \pm 0,82$	2,00–5,66	$3,65 \pm 0,48$	0–10,68
Хромосомные мутации	$10,83 \pm 2,84$	$4,80 \pm 0,94$	2,00–7,48	$3,78 \pm 0,49$	0–10,68
Клетки с фрагментами	$8,33 \pm 2,52$	$3,26 \pm 0,78$	2,00–4,72	$2,99 \pm 0,44$	0–9,71
Фрагменты хромосом	$10,00 \pm 2,74$	$3,45 \pm 0,80$	2,00–5,66	$3,05 \pm 0,44$	0–9,71
В том числе					
парные фрагменты	$5,00 \pm 1,99$	$2,50 \pm 0,68$	1,87–3,92	$1,46 \pm 0,31$	0–3,96
одиночные фрагменты	$5,00 \pm 1,99$	$0,77 \pm 0,38$	0–1,89	$1,59 \pm 0,32$	0–6,80
Клетки с разрывами в области центромеры	$0,83 \pm 0,83$	$1,34 \pm 0,50$	0–4,67	$0,66 \pm 0,21$	0–4,95
Разрывы в области центромеры	$0,83 \pm 0,83$	$1,34 \pm 0,50$	0–4,67	$0,73 \pm 0,22$	0–4,95

Таблица 2

Частота геномных мутаций у носительницы транслокации, её полусибсов и сверстниц, %

Показатели	Транслокант	Полусибсы		Сверстницы	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	lim	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	lim
Полиплоидные клетки	0,83±0,83	1,34±0,50	0,93–2,00	1,92±0,35	0–3,92
В том числе					
триплоиды	0,83±0,83	0,00	0,00–0,00	0,20±0,11	0–0,99
тетраплоиды	0,00	1,34±0,50	0,93–2,00	1,73±0,34	0–3,92
Анеуплоидные клетки	1,67±1,17	8,25±1,21	3,92–10,38	7,37±0,67	3,92–12,15
Гиперплоидные клетки	0,00±0,00	0,58±0,33	0–1,87	1,26±0,29	0–3,74
В том числе					
2n=61	0,00±0,00	0,38±0,27	0–0,94	1,06±0,26	0–3,74
2n=62	0,00±0,00	0,19±0,19	0–0,93	0,20±0,11	0–1,96
Гипоплоидные клетки:					
В том числе					
2n=59	1,67±1,17	7,68±1,17	3,92–10,38	5,97±0,61	3,92–8,74
2n=59	1,67±1,17	6,72±1,10	3,92–8,49	4,51±0,53	1,96–8,26
2n=58	0,00±0,00	0,96±0,43	0–1,89	1,59±0,32	0,63–4,85
Клетки с изменённым числом хромосом	2,50±1,43	9,60±1,29	4,90–12,26	9,29±0,75	4,90–13,08
Диплоидные клетки	97,50±1,43	90,60±1,28	87,74–95,10	90,71±0,75	86,92–95,10

сительница транслокации также опережает полусибсов ($P<0,05$) и коров-сверстниц ($P<0,001$). По показателю клеток с фрагментами хромосом корова с транслокацией одинаково превосходит как полусибсов ($P<0,05$), так и сверстниц ($P<0,05$). Та же закономерность сохраняется и по частоте фрагментов хромосом в клетках животных – транслокант превосходит каждую из групп животных в равной степени ($P<0,01$). По частоте парных фрагментов хромосом в клетках различия выявлены только между носительницей мутации и группой сверстниц ($P<0,05$). Одиночные фрагменты хромосом в клетках у транслоканта регистрировали чаще в сравнении с полусибсами ($P<0,01$) и сверстницами ($P<0,05$). Следует отметить, что соотношение одиночных и парных фрагментов у транслоканта и в группе сверстниц было практически одинаковое (1 : 1). Достоверных различий по частоте хромосомных мутаций между группами полусибсов и коров-сверстниц не установлено.

Наблюдается тенденция к росту числа клеток, содержащих две и более хромосомных мутаций у носительницы транслокации, т.е. так называемых мультиабберрантных клеток. Аналогичная закономерность была выявлена нами в исследованиях цитогенетической нестабильности поросят – носителей робертсоновской транслокации [10]. В настоящее время точно не выявлены причины формирования такого типа клеток, однако принято считать их маркерами нарушения гомеостатиче-

ских реакций организма. В группе сверстниц у одной из коров не выявлено структурных мутаций.

Между животными установлен ряд достоверных различий по частоте геномных мутаций (см. табл. 2).

В процессе анализа спектра плоидности клеток отмечен интересный факт того, что у коровы с транслокацией все полиплоидные клетки имели триплоидный набор.

При этом животное со сбалансированной структурной перестройкой отличалось повышенным уровнем этих клеток в сравнении со своими сверстницами ($P<0,01$). Анализ данных литературы показывает, что при спонтанном мутагенезе чаще всего встречаются клетки с тетраплоидным набором хромосом, чем с другими наборами, вне зависимости от вида животного [13, 14]. Однако по уровню тетраплоидии полусибсы ($P<0,05$) и сверстницы ($P<0,01$) превосходили носительницу транслокации. Как считают В.И. Глазко и И.А. Созинов [15], полиплоидия, амплификация генов и другие подобные процессы приводят к увеличению объема генома, что, в свою очередь, определяет скорость клеточного цикла и влияет на показатели жизнеспособности организма.

Анализ частоты геномных нарушений у исследованных животных показал, что в группах сверстниц и полусибсов наблюдается повышенная частота анеуплоидных клеток в сравнении с носительницей мутации ($P<0,01$). Это превосходство формируется главным образом за счёт повышенной частоты гипоплоидных клеток и раз-

личия с полусибсами ($P < 0,01$) и со сверстницами ($P < 0,05$), и, в частности, по частоте клеток с нехваткой одной хромосомы ($P < 0,01$).

Повышенная частота гиперплоидных клеток отмечена как у полусибсов ($P < 0,001$), так и у сверстниц ($P < 0,05$). Различия по уровню клеток с одной добавочной хромосомой между транслокантом и сверстницами были статистически значимыми. По уровню клеток с изменённым количеством хромосом полусибсы и сверстницы одинаково превосходили транслоканта ($P < 0,01$). Как и в случае с хромосомными aberrациями, между полусибсами и сверстницами достоверных различий по частоте геномных мутаций не выявлено.

Интересно отметить, что у коровы – носительницы транслокации не было выявлено клеток с избытком одной или двух хромосом, в то время как в группе коров без мутаций только у 37,5% животных не было зарегистрировано таких клеток.

ВЫВОДЫ

1. На основании полученных данных по уровню соматической нестабильности хромосом у исследованных животных можно отметить, что у коровы, имеющей сбалансированную мутацию, затрагивающую структуру хромосом, поддерживается на достаточно высоком уровне частота пула клеток с диплоидным набором хромосом. В группе сверстниц и полусибсов наблюдается обратная закономерность.
2. Цитогенетическая нестабильность носительницы реципрокной транслокации была обусловлена главным образом повышенной фрагментацией хромосом, сопровождающейся ростом мультиабберрантных клеток. Это может свидетельствовать о том, что у данного животного наблюдается сбой в системе репарации повреждений ДНК и существенное снижение активности регуляторов апоптоза, что не способствует устранению мутантных клеток из организма.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кочнева М.Л., Петухов В.Л. Цитогенетический мониторинг // Практик. – 2006. – № 3. – С. 40–43.
2. Акифьев А.П., Потапенко А.И. Ядерный генетический материал как инициальный субстрат старения животных // Генетика. – 2001. – Т. 31, № 11. – С. 1445–1458.
3. A new balanced autosomal reciprocal translocation in cattle revealed by banding techniques and human-painting probes / L. Iannuzzi, L. Molteni, G.P. Di Meo [et al.] // Cytogenetic and Genome Research. – 2001. – Vol. 94, N 3–4. – P. 225–228.
4. Characterization of a balanced reciprocal translocation, rcp (9;11) (q27; q11) in cattle / L. De Lorenzi, A. De Giovanni, L. Molteni [et al.] // Cytogenetic and Genome research. – 2007. – Vol. 119, N 3–4. – P. 231–234.
5. A Case of Y-Autosome reciprocal translocation in a Holstein-Friesian Bull / M. Switonski, I. Szczerbal, W. Krumrych, J. Nowacka-Woszek // Cytogenetic and Genome research. – 2011. – Vol. 132, N 1–2. – P. 22–25.
6. De Schepper G. G., Aalbers J. G., Te Brake J. H. Double reciprocal translocation heterozygosity in a bull // The Veterinary Record. – 1982. – Vol. 110, N 9. – P. 197–199.
7. A balanced autosomal reciprocal translocation in an azoospermic bull / H. A. Ansari, H. R. Jung, R. Hediger [et al.] // Cytogenetics and Cell Genetics. – 1993. – Vol. 62. – P. 117–123.
8. A case of azoospermia in a bull carrying a Y-autosome reciprocal translocation / L. Iannuzzi, L. Molteni, G.P. Di Meo [et al.] // Cytogenetics and Cell Genetics. – 2001. – Vol. 95. – P. 225–227.
9. Генетическое действие излучений с разными физическими характеристиками на клетки человека и млекопитающих / Е.А. Красавин, Р.Д. Говорун, Н.Л. Шамова [и др.] // Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2004. – Т. 35, № 6. – С. 1484–1508.
10. Кочнева М.Л. Мониторинг популяций сельскохозяйственных животных в разных экологических условиях: дис. ... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 2005. – 291 с.
11. Новый случай реципрокной транслокации rcp (13; 26) у крупного рогатого скота / М.Л. Кочнева, А.Н. Жиденова, Л.С. Билтуева, Т.Ю. Киселева // С.-х. биология. – 2011. – № 6. – С. 84–89.
12. A New Case of an Inherited Reciprocal Translocation in Cattle: rcp (13; 26) (q24; q11) / L. Biltueva, A. Kulemzina, N. Vorobieva [et al.] // Cytogenetic and genome research. – 2014. – Vol. 144 (3). – P. 205–208.
13. Кочнева М.Л. Соматическая хромосомная нестабильность у свиней в норме и при патологии // С.-х. биология. – 2003. – № 2. – С. 69–72.

14. Куликова С.Г., Эрнст Л.К., Петухов В.Л. Соматические хромосомные aberrации у крупного рогатого скота // Докл. РАСХН. – 1996. – № 6. – С. 33.
15. Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. – Киев: Урожай, 1993. – Т. 526. – С. 147.
1. Kochneva M.L., Petuhov V.L. *Citogeneticheskij monitoring* [Praktik], no. 3 (2006): 40–43.
2. Akif'ev A.P., Potapenko A.I. *Yadernyj geneticheskij material kak inicial'nyj substrat stareniya zhivotnyh* [Genetika], T. 31, no. 11 (2001): 1445–1458.
3. Iannuzzi L., Molteni L., Di Meo G.P. et al. A new balanced autosomal reciprocal translocation in cattle revealed by banding techniques and human-painting probes. *Cytogenetic and Genome Research*, Vol. 94, no. 3–4 (2001): 225–228.
4. De Lorenzi L., De Giovanni A., Molteni L. et al. Characterization of a balanced reciprocal translocation rcp (9;11) (q27; q11) in cattle. *Cytogenetic and Genome research*, Vol. 119, no. 3–4 (2007): 231–234.
5. Switonski M., Szczerbal I., Krumrych W., Nowacka-Woszek J. A Case of Y-Autosome reciprocal translocation in a Holstein-Friesian Bull. *Cytogenetic and Genome research*, Vol. 132, no. 1–2 (2011): 22–25.
6. De Schepper G.G., Aalbers J.G., Te Brake J.H. Double reciprocal translocation heterozygosity in a bull. *The Veterinary Record*, Vol. 110, no. 9 (1982): 197–199.
7. Ansari H.A., Jung H.R., Hediger R. et al. A balanced autosomal reciprocal translocation in an azoospermic bull. *Cytogenetics and Cell Genetics*, Vol. 62 (1993): 117–123.
8. Iannuzzi L., Molteni L., Di Meo G.P. et al. A case of azoospermia in a bull carrying a Y-autosome reciprocal translocation. *Cytogenetics and Cell Genetics*, Vol. 95 (2001): 225–227.
9. Krasavin E.A., Govorun R.D., SHmakova N.L., Koshlan' I.V., Nasonova E.A., Repin M.V. *Geneticheskoe dejstvie izluchenij s raznymi fizicheskimi harakteristikami na kletki cheloveka i mlekopitayushchih* [Fizika ehlementarnyh chastic i atomnogo yadra], T. 35, no. 6 (2004): 1484–1508.
10. Kochneva M.L. *Monitoring populyacij sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh v raznyh ehkologicheskikh usloviyah* [Dis. ... d-ra biol. nauk]. Novosibirsk, 2005. 291 p.
11. Kochneva M.L., Zhidenova A.N., Biltueva L.S., Kiseleva T.YU. *Novyj sluchaj reciproknoj translokacii rcp (13; 26) u krupnogo rogatogo skota* [Sel'skohozyajstvennaya biologiya], no. 6 (2011): 84–89.
12. Biltueva L., Kulemzina A., Vorobieva N., Perelman P., Kochneva M., Zhidenova A., Graphodatsky A. A New Case of an Inherited Reciprocal Translocation in Cattle: rcp (13; 26) (q24; q11). *Cytogenetic and genome research*, Vol. 144 (3) (2014): 205–208.
13. Kochneva M.L. *Somaticheskaya hromosomnaya nestabil'nost' u svinej v norme i pri patologii* [Sel'skohozyajstvennaya biologiya], no. 2 (2003): 69–72.
14. Kulikova S.G., EHrnst L.K., Petuhov V.L. *Somaticheskije hromosomnye aberracii u krupnogo rogatogo skota* [Doklady Rossijskoj akademii sel'skohozyajstvennyh nauk], no. 6 (1996): 33.
15. Glazko V.I., Sozinov I.A. *Genetika izofermentov zhivotnyh i rastenij*. Kiev: Urozhaj, T. 526 (1993): 147.

ASSOCIATION OF RECIPROCAL TRANSLOCATION RCP (13; 26) (Q24; Q11) WITH UNSTABLE GENOME OF THE CATTLE SOMATIC CELLS

Kochneva M. L., Zhidenova A. N., Zhuchaev K. V.

Key words: reciprocal translocation, somatic chromosome instability, genome mutations, chromosome mutations, cattle.

Abstract. *The paper explores somatic chromosome instability of Holstein black-and-white healthy cows when an animal was a carrier of reciprocal translocation rcp (13; 26) (q24; q11). The researchers observed high frequency of chromosome mutations of translocation carrier compared with half-sibs ($P < 0.05-0.01$) and herd-mates ($P < 0.05-0.001$). Frequency of chromosome fragments of translocation carrier was 3 times higher than that of animals of the control group ($P < 0.01$). The authors found out that multiaberrant cells containing two and more chromosome mutations of translocation carrier tend to be increased. Reciprocal translocation can be followed by growth of triploid chromosomes and this is not common for spontaneous mutagenesis. The research investigated aneuploid cells and revealed high features of herd-mates and half-sibs compared with mutation carrier ($P < 0.01$). The significant differences are explained by high frequency of hypoploid cells and exactly frequency of cells with deficiency chromosome ($P < 0.01$). The authors suppose, that reciprocal translocation carrier suffers from reparative system of DNA damages that doesn't lead to elimination of mutation cells.*