

**ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЫШЕВИДНЫХ ГРЫЗУНОВ
ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ РАДИОНУКЛИДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ****О. А. Ковалева, О. О. Бурдо, Т. Т. Глазко***Институт агроэкологии УААН, Киев*

У представителей двух видов грызунов – *Cletrionomys glareolus* и *Microtus arvalis*, обитающих на фоне повышенного уровня радионуклидного загрязнения, выполнен сравнительный анализ частот встречаемости цитогенетических аномалий в клетках костного мозга. Выявлены видоспецифические особенности вовлечения в изменчивость разных цитогенетических характеристик: для *M. arvalis* типично увеличение количества лейкоцитов с микроядрами, для *C. glareolus* типично увеличение хромосомных aberrаций. Наблюдалось накопление радиорезистентных особей в местах с высоким уровнем ионизирующего излучения.

Биоиндикацию территорий, загрязненных радионуклидами после техногенных катастроф (Кыштым, Чернобыль), традиционно выполняют на мышевидных грызунах, у которых исследуют частоты встречаемости соматических клеток с цитогенетическими аномалиями, как правило, среди клеток костного мозга.

Для проведения радиоэкологического мониторинга используются виды, наиболее многочисленные и широко распространенные в исследуемой зоне (синантропные или дикие) [1, 2]. Однако при таком подходе возникает целый ряд проблем. Так, к мышевидным грызунам относится большое количество видов, каждый из которых отличается количеством и морфологией хромосом. Диплоидный набор хромосом ($2n = 30$), как у полевки-экономки (*Microtus oeconomus*), является наименьшим по количеству хромосом среди мышевидных грызунов [3]. Виды с числом хромосом 54 или 56 относятся к таксономически более примитивным (древним), а их кариотипы, в основном, содержат одноплечие хромосомы (acrocentрики). Можно ожидать, что отличия радиочувствительности хромосомного аппарата каждого вида может зависеть от преобладания в кариотипе метацентрических либо акроцентрических хромосом. На точность цитогенетического анализа существенно влияет величина временного промежутка между техногенной катастрофой и исследованием, поскольку у каждого вида селекция на радиорезистентность может идти с разной скоростью. Кроме того, при использовании цитогенетических данных для биоиндикации средовых генотоксичных воздействий принципиальным становится исследованность видоспецифических особенностей спонтанного мутагенеза в соматических клетках разных видов. Также возникает проблема индивидуальных и групповых оценок дестабилизации хромосомного аппарата и их связей с факторами окружающей среды. Учитывая вышеизложенное, нами было проведено комплексное исследование соматического мутагенеза в клетках костного мозга у двух видов мышевидных грызунов, отловленных в местообитаниях с низким (менее 200 kBк/м^2) и высоким (более 7000 kBк/м^2) уровнями радионуклидного загрязнения спустя разное время после аварии на Чернобыльской АЭС (ЧАЭС).

Материалы и методы

Исследования проводились на полевках двух видов – *Cletrionomys glareolus* (рыжая полевка) и *Microtus arvalis* (блуждающая полевка), отловленных в 1996 - 2001 гг. в зоне отчуждения ЧАЭС в пунктах с разным уровнем радионуклидного загрязнения: высокий уровень – “Рыжий лес”, Чистополька, оз. Глубокое ($20000 - 40000 \text{ kBк/м}^2$); промежуточный – Янов, Копачи ($4500 - 11000 \text{ kBк/м}^2$) и условно контрольный – меньше 700 kBк/м^2 (данные по цезию-137 приводятся по Атласу Украины по радиационному загрязнению на 1998 г.).

Препараты клеток костного мозга готовились общепринятым способом (без использования колхицина). В клетках костного мозга учитывали метафазы со структурными хромо-

сомными абберациями (хромосомные и хроматидные разрывы, фрагменты, кольцевые хромосомы - ХА) и двумя типами анеуплоидии: А1 - $2n \pm 6$ хромосом и А2 - $2n \pm 1$ хромосома. Количество двуядерных лейкоцитов (ДЯ) и лейкоцитов с микроядрами (ЛМЯ) считали на тех же препаратах в клетках с сохраненной цитоплазмой. Для определения митотического индекса (МИ) и частоты встречаемости ДЯ, ЛМЯ анализировали по 3000 клеток.

Препараты окрашивали красителем Гимза (Gymza, Merk). Для анализа использовался бинокулярный микроскоп производства Carl Zeiss Jena при увеличении в 1000 раз. Статистическую достоверность различий по цитогенетическим аномалиям между группами животных оценивали по критерию Стьюдента (tS).

Результаты и обсуждение

Выбранные для анализа виды относятся к разным родам и разнятся по таксономическому положению. Рыжая полевка является более таксономически древним видом ($2n = 56$, $Fna = 56$) с преимущественно акроцентрическими хромосомами по сравнению с обыкновенной полевкой ($2n = 46$ и $Fna = 84$). Поэтому на первом этапе наших исследований для этих видов выполнялась оценка информативности различных типов цитогенетических аномалий для общей характеристики мутагенеза, как спонтанного, так и индуцированного ионизирующим излучением.

При сравнении частот встречаемости различных цитогенетических аномалий у обыкновенной полевки (табл. 1) наиболее информативными и радиочувствительными признаками являются МИ, ЛМЯ и ДЯ. А у рыжей полевки (табл. 2) наиболее радиочувствительной характеристикой является ХА. Следовательно, можно выделить цитогенетические аномалии, оценка которых позволяет у двух этих видов выявить видоспецифичные особенности радиационного ответа на хроническое низкодозовое ионизирующее облучение: у *M. arvalis* это микроядерный тест, а у *C. glareolus* – хромосомные и хроматидные разрывы, фрагменты и кольцевые хромосомы. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения подбора видоспецифичных, максимально информативных характеристик состояния хромосомного аппарата для биоиндикации генотоксических воздействий.

Таблица 1. Средние значения доли клеток с цитогенетическими аномалиями у обыкновенной полевки (*M. arvalis*), %

Количество животных	Количество метафаз	А1	А2	ХА	МИ	ДЯ	ЛМЯ	Уровень радионуклидного загрязнения
15	948	44,4 ± 5,1*	8,6 ± 2,8	2,5 ± 0,6	4,5 ± 0,9	5,0 ± 0,8	3,0 ± 0,4	Условно контрольный
12	959	44,4 ± 8,3	19,7 ± 5,8	3,9 ± 0,8	6,7 ± 0,9	6,7 ± 0,3	1,3 ± 0,7	Высокий 1996 - 1999 г.
16	710	26,5 ± 2,7*	3,1 ± 0,8	2,5 ± 0,3	6,1 ± 0,6	7,8 ± 1,6	3,1 ± 0,5	Высокий 2001 г.

* - $P < 0,05$.

Для определения динамики изменений цитогенетических аномалий в костном мозге сравнивались результаты, полученные в разные годы у животных, отловленных в одних и тех же местообитаниях, с разным уровнем радионуклидного загрязнения. Результаты представлены в табл. 1 (*M. arvalis*) и табл. 2 (*C. glareolus*).

Таблица 2. Средние значения доли клеток с цитогенетическими аномалиями у рыжей полевки (*C. glareolus*), %

Количество животных	Количество метафаз	A1	A2	ХА	МИ	ДЯ	ЛМЯ	Уровень радионуклидного загрязнения
4	97	33,7 ± 6,0	9,0 ± 3,5	1,2 ± 0,7*	3,2 ± 0,6*	3,5 ± 0,6	5,5 ± 1,5	Условно контрольный
8	598	31,2 ± 2,4	8,9 ± 1,4	8,1 ± 4,0	5,7 ± 1,0*	5,2 ± 0,8	3,2 ± 0,8	Промежуточный 1997 - 1999 гг.
3	252	33,7 ± 0,9	5,0 ± 2,1	7,3 ± 3,4	10,3 ± 1,9*	7,0 ± 1,0*	9,3 ± 1,9	“Рыжий лес” 1996 г.
8	535	34,6 ± 6,2	10,5 ± 3,0	3,5 ± 0,8*	5,2 ± 1,2	3,7 ± 1,1	6,5 ± 0,7	“Рыжий лес” 1999 г.
6	356	35,2 ± 2,8	6,3 ± 1,1	0,9 ± 0,3	8,0 ± 2,5	9,8 ± 1,7**	8,0 ± 1,2	“Рыжий лес” 2001 г.

* - $P < 0,05$.** - $P < 0,01$.

У обыкновенной полевки наблюдается значительное по сравнению с контролем снижение уровня цитогенетических аномалий по показателям А1, А2 и ХА в зоне высокого уровня радиационного загрязнения с 1996 - 1999 по 2001 г.

У представителей рыжей полевки, отловленных в зоне с высоким уровнем радионуклидного загрязнения (см. табл. 2) уменьшение уровня хромосомных aberrаций в 2001 г. достигло показателя $0,9 \pm 0,3$ - это меньше, чем в условно контрольной популяции. Полученные данные позволяют предположить наличие отбора на радиорезистентность у рыжих полевков с 1996 г., о чем свидетельствует повышение количества особей, устойчивых к ионизирующему излучению. Поскольку в области со средним уровнем ионизирующего излучения подобного понижения уровня цитогенетических аномалий не происходит, считаем, что в этой области отбор радиорезистентных особей проходит более медленно.

Для большей объективности биоиндикации территорий, загрязненных генотоксическими агентами, особое значение имеет вопрос о внутригрупповой гетерогенности используемых мелких мышевидных грызунов. Известно множество причин, которые могут приводить к увеличению частот встречаемости цитогенетических аномалий и без экзогенных генотоксических воздействий. К ним относятся генетически детерминированные сниженные возможности репарации хромосомного аппарата, антиоксидантных систем, возрастные, половые отличия, реакция на факторы физиологического стресса и ряд других. Такие внутривидовые отличия проявляются в большой ошибке среднего при групповой оценке контрольного уровня значения цитогенетических аномалий.

Как видно из табл. 1 и 2, по ряду усредненных значений цитогенетических аномалий отличия между группами статистически недостоверны из-за большой ошибки среднего. Большая ошибка среднего, с одной стороны, обусловлена применением стандартного метода представления экспериментальных данных, при котором в таблицы вносятся среднее значение и стандартное отклонение по каждой группе животных, а индивидуальная изменчивость животных в группах не учитывается; с другой стороны, эта ошибка обусловлена высокими показателями уровня цитогенетических аномалий у отдельных особей. Если же в группах подсчитать количество особей, у которых частота встречаемости цитогенетических аномалий превышает средние контрольные значения, то межгрупповые отличия становятся более ярко выраженными (табл. 3 и 4).

Для обыкновенной полевки средние значения (%) в условно контрольной популяции оказались следующими: $A1 = 44,4 \pm 5,1$, $A2 = 8,6 \pm 2,8$, $ХА = 2,5 \pm 0,6$; в условиях высокого

Таблица 3. Процент животных среди обыкновенных полевков (*M. arvalis*) с выраженной дестабилизацией кариотипа

A1	A2	ХА	Уровень радионуклидного загрязнения
50	33	50	Условно контрольный
75	67	75	Высокий 1996 - 1999 гг.
6	6	50	Высокий 2001 г.

Таблица 4. Процент животных среди рыжих полевков (*C. glareolus*) с выраженной дестабилизацией кариотипа

A1	A2	ХА	Уровень радионуклидного загрязнения
50	50	50	Условно контрольный
13	13	100	Промежуточный 1997 - 1999 гг.
30	0	100	“Рыжий лес” 1996 г.
20	50	75	“Рыжий лес” 1999 г.
30	20	30	“Рыжий лес” 2001 г.

уровня загрязнения в 1996 - 1999 гг. – $A1 = 44,4 \pm 8,3$, $A2 = 19,7 \pm 5,8$, $ХА = 3,9 \pm 0,8$; а в 2001 г. – $A1 = 26,5 \pm 2,7$; $A2 = 3,1 \pm 0,8$; $ХА = 2,5 \pm 0,3$. Видно, что по ряду усредненных значений цитогенетических аномалий отличия между группами статистически недостоверны из-за большой ошибки среднего. Однако если во всех группах пересчитать количество особей, у которых частота встречаемости цитогенетических аномалий превышает усредненные контрольные значения, то межгрупповые отличия становятся очевидными. Так, в контрольной группе доля таких особей оказалась по $A1 - 50$, $A2 - 33$, $ХА - 50$ %; в группе на фоне высокого радионуклидного загрязнения в 1996 - 1999 гг. по $A1 - 75$, $A2 - 67$, $ХА - 75$ %; в 2001 г. – по $A1 - 6$, $A2 - 6$, $ХА - 50$ %.

У представителей вида рыжей полевки средние контрольные значения были: $A1 = 33,7 \pm 6$; $A2 = 9,0 \pm 3,5$; $ХА = 1,2 \pm 0,7$. В пунктах отлова с промежуточным уровнем загрязнения в 1997 - 1999 гг. – $A1 = 31,2 \pm 2,4$; $A2 = 8,9 \pm 1,4$; $ХА = 8,1 \pm 4,0$. Количество особей с более высокими, чем средние значения в контроле, по $ХА$ было 100 %. Для популяций рыжей полевки, отловленных в “Рыжем лесу”, в 1996 г. – $A1 = 33,7 \pm 0,9$; $A2 = 5,0 \pm 2,1$; $ХА = 7,3 \pm 3,4$ (30, 0 и 100 % соответственно); в 1999 г. – $A1 = 34,6 \pm 6,2$; $A2 = 10,5 \pm 3,0$; $ХА = 3,5 \pm 0,8$ (20, 50 и 75 % соответственно); в 2001 г. – $A1 = 35,2 \pm 2,8$; $A2 = 6,3 \pm 1,1$; $ХА = 0,9 \pm 0,3$ (30, 20 и 30 % соответственно).

У обыкновенной полевки при представлении результатов стандартным способом без учета индивидуальных особенностей особей различия по такому показателю, как количество $ХА = 2,5 \pm 0,6$; в условиях высокого уровня загрязнения в 1996 - 1999 гг. – $ХА = 3,9 \pm 0,8$; а в 2001 г. – $ХА = 2,5 \pm 0,3$, что в контрольной группе будет составлять 50 %. В группе животных, отловленных в 1996 - 1999 гг. на фоне высокого радионуклидного загрязнения, – 75 %, а в 2001 г. – 50 %. У представителей рыжей полевки средние контрольные значения $ХА = 1,2 \pm 0,7$. В пунктах отлова с промежуточным уровнем загрязнения в 1997 - 1999 гг. – $ХА = 8,1 \pm 4,0$. Количество особей с более высокими, чем средние значения в контроле, по $ХА$ было 100 %. Для популяций рыжей полевки, отловленных в “Рыжем лесу” в 1996 г., $ХА = 7,3 \pm 3,4$ (100 %); в 1999 г. – $ХА = 3,5 \pm 0,8$ (75 %); в 2001 г. – $ХА = 0,9 \pm 0,3$ (30 %).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать следующие выводы. В связи с разным количеством хромосом и отличной их морфологией каждый вид имеет свои видоспецифические и информативные признаки: у обыкновенной полевки такими показателями являются МИ, ЛМЯ, у рыжей полевки – $ХА$.

В местах с высоким уровнем ионизирующего излучения идет селекция на радиорезистентность, причем чем выше уровень радионуклидного загрязнения, тем выше скорость селекции.

Для получения более точных и представительных данных необходимо учитывать внутрипопуляционную изменчивость животных по стабильности генетического аппарата, количество особей, у которых частота встречаемости цитогенетических аномалий превышает средние контрольные значения, что и делает межгрупповые отличия более ярко выраженными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гилева Э. А. Эколого-генетический мониторинг с помощью грызунов (уральский опыт). - Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 1997. - 105 с.
2. Кудяшева А. Г., Шишкина Л. Н., Шевченко О. Г. и др. Биологические эффекты радиоактивного загрязнения в популяциях мышевидных грызунов. - Екатеринбург: Уро РАН, 2004. - 214 с.
3. Matthe R. The chromosome formulae of Eutherian mammals // Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution / Eds. A. B. Chiarelli, E. Capanna. - London: Acad. Press, 1973. - P. 531 - 616.

ПРОБЛЕМИ ВИКОРИСТАННЯ МИШОПОДІБНИХ ГРИЗУНІВ ДЛЯ БІОІНДИКАЦІЇ РАДІОНУКЛІДНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

О. А. Ковальова, О. О. Бурдо, Т. Т. Глазко

У представників двох видів гризунів – *Clethrionomys glareolus* та *Microtus arvalis*, які живуть в умовах підвищеного рівня радіонуклідного забруднення, виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах кісткового мозку. Виявлено видоспецифічні особливості втягування в мінливість різних цитогенетичних характеристик: для *M. arvalis* типовим є збільшення кількості лейкоцитів з мікроядрами; для *C. glareolus* типовим є збільшення хромосомних аберацій. Спостерігалось накопичення радіорезистентних особин у місцях з високим рівнем іонізуючого випромінювання.

PROBLEMS OF SMALL RODENT USE FOR RADIOACTIVE POLLUTION BIOINDICATION

O. A. Kovalova, O. O. Burdo, T. T. Glazko

Comparative analysis of cytogenetic anomaly frequencies in bone marrow cells of *Clethrionomys glareolus* and *Microtus arvalis* on the background of high level of radio nuclide pollution was carried out. It was revealed that the involvement of different cytogenetic characteristics in variability is species-specific: an increase in leukocytes with micronuclei was typical for *M. arvalis*, but the increase in chromosome aberration was typical for *C. glareolus*. Increase of the number of radiation resistant animals in places with high level of radioactive pollution was observed.

Поступила в редакцію 06.09.05,
после доработки – 09.11.05.