

## ЦИТОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 575.224.46.044

**Н.Н. Ильинских, С.А. Козлова, И.Н. Ильинских,  
Е.Н. Ильинских, А.Ю. Юркин**

*Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск)*

### **ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОСТНОМ МОЗГЕ КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ (*Clethrionomys rutilus* Pallas), ОБИТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ КАДМИЯ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ (РЕСПУБЛИКА АЛТАЙ)**

*Установлено, что у красных полевок (*Clethrionomys rutilus*), отловленных в районе села Чаган-Узун Республики Алтай, расположенного в зоне геохимической провинции с высоким природным содержанием в окружающей среде кадмия, повышен уровень клеток костного мозга с нарушениями в числе и структуре хромосом. Корреляционный анализ свидетельствует о том, что имеется прямая зависимость между концентрацией в крови животных кадмия и уровнем некоторых типов цитогенетических нарушений.*

**Ключевые слова:** геохимическая провинция; кадмий; Республика Алтай; *Clethrionomys rutilus*; костный мозг; хромосомные аномалии.

#### **Введение**

На территории Республики Алтай располагается значительное количество биогеохимических провинций, которые характеризуются высокой концентрацией в окружающей среде химических элементов или их соединений природного происхождения. Здесь практически отсутствуют крупные промышленные предприятия, и в связи с этим антропогенный прессинг на природу минимален. Особое внимание привлекает район с. Чаган-Узун, расположенного в зоне геохимической аномалии с высокой концентрацией в горных породах и в почве кадмия. Содержание кадмия в почве в этом месте превышает фоновые значения более чем в 400 раз, достигая в растениях уровня 1,6 мг/кг [1]. Установлено, что кадмий ингибирует активность ДНК-полимераз, влияет на процессы деконденсации ДНК, нарушает синтез тимидилата и тимидинкиназы и соответственно репликации молекул ДНК [2–4]. У крыс, подвергшихся действию аэрозоля, содержавшего кадмий, развивается рак лёгких [4]. Способность кадмия индуцировать мутации доказана в работе Л.В. Чопикашвили с соавт. [5].

Учет частоты аберрантных клеток в костном мозге мелких мышевидных грызунов может быть использован для оценки генотоксических свойств окружающей среды в целом при изучении природных популяций [6–7]. Число работ по исследованию цитогенетическими методами природных популя-

ций мелких мышевидных грызунов сравнительно невелико [6–12]. Между тем важность таких работ состоит в накоплении информации по фоновому уровню хромосомных нарушений и диапазонам ответа различных видов при воздействии негативных факторов разной природы. Логично предположить, что у особей, находящихся под воздействием сильного мутагенного фактора, частота событий, ведущих к генетической нестабильности, существенно возрастает, и это может быть выявлено даже на сравнительно малых выборках, если использовать в качестве маркеров нестабильности цитогенетические показатели [9].

Целью настоящей работы явилось изучение роли кадмия в цитогенетических изменениях клеток костного мозга у фонового вида – красной полевки (*Clethrionomys rutilus*), отловленной в районе с. Чаган-Узун Республики Алтай, расположенного в зоне геохимической провинции с высоким содержанием в окружающей среде кадмия, в сравнении с животными того же вида, отловленными вблизи с. Турочак, где в окружающей среде содержание кадмия находится на уровне кларка земной коры.

### Материалы и методики исследования

Всего отловлено 68 особей красной полевки вблизи с. Чаган-Узун, расположенного в зоне кадмиевой геохимической аномалии, и 56 особей – вблизи с. Турочак (контроль), находящегося в экологически благоприятном регионе. Отлов зверьков проводили ловушко-линиями из 50 живоловок [12]. Препараты метафазных хромосом костного мозга приготавливали по общепринятым методам [13–14]. При исследовании учитывали все типы структурных aberrаций хромосом (кроме гепов), а также число гиперплоидных и полиплоидных клеток, анализируя у каждого животного максимальное число доступных для этой цели клеток. Всего у животных, отловленных вблизи с. Чаган-Узун, проанализировано 5 745, а у животных из окрестностей с. Турочак – 5 756 метафазы.

Для получения интегральной характеристики цитогенетического гомеостаза была использована балльная оценка, предложенная специалистами из Центра экологической политики России [15]: 1 балл – условно нормальное состояние – частота aberrантных клеток до 5%; 2 балла – низкая степень изменения частоты aberrантных клеток в пределах 6–10%; 3 балла – средняя степень изменения частоты aberrантных клеток в пределах 11–15%; 4 балла – высокая степень изменения – частота aberrантных клеток в пределах 16–20%; 5 баллов – критическое состояние – частота aberrантных клеток выше 20%.

Условно нормальный уровень находится в пределах колебаний спонтанной частоты aberrантных клеток. Существует мнение, что частоты структурных хромосомных aberrаций, пробелов, анеуплоидии и полиплоидии у самцов и самок мелких грызунов разного возраста и вида статистически значимо не различаются [16]. В связи с тем что кадмий аккумулируется в организме [17], у животных была определена концентрация кадмия в крови.

Содержание кадмия в крови животного определяли колориметрическим методом при длине волны 508 нм с использованием спектрофотометра СФ-46 (Россия) [18]. Все пробы высушивались в муфельной печи при температуре

50°C до твердого состояния и истирались в порошок. Аликвотную часть пробы, содержащую ионы кадмия, обрабатывали аммиаком и подвергали экстракции хлороформом, содержащим 0,004% дитизона.

Статистическую обработку данных проводили с применением критерия Стьюдента для независимых выборок и корреляционного анализа по Спирмену, используя пакет статистических компьютерных программ StatSoft Statistica 6.0 [19]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

### Результаты исследования

Анализ уровня клеток костного мозга с аномалиями в числе и структуре хромосом свидетельствует о существенном превышении этих показателей у животных, обитающих в районе с. Чаган-Узун, по сравнению с данными цитогенетического анализа животных, отловленных вблизи с. Турочак (табл. 1). Из 56 отловленных особей Турочакской популяции только 8, согласно номенклатуре, предложенной Центром экологической политики России [15], можно отнести к типу с низкой и средней степенью изменения частоты аберрантных клеток. В остальных случаях число аберрантных клеток не превышало 5%, т.е. отвечало условно нормальному состоянию цитогенетической изменчивости. В то же время у 87,8% красных полевок, отловленных вблизи с. Чаган-Узун, наблюдался достоверно повышенный уровень цитогенетических нарушений с достоверным возрастанием числа клеток с одиночными фрагментами, двухударными хромосомными абберациями, гиперплоидным и полиплоидным хромосомными наборами. Среди двухударных хромосомных аббераций часто наблюдались клетки с дицентрическими и кольцевыми хромосомами. Установлено, что в Чаган-Узунской популяции число аберрантных клеток было минимальным у сеголетов и максимальным – у старых животных. Такой закономерности не отмечено у животных Турочакской популяции. В обеих популяциях отличий в уровне цитогенетических нарушений у самок и самцов не наблюдалось.

Влияние кадмия как возможной первопричины повышения числа клеток с цитогенетическими нарушениями в костном мозге у животных Чаган-Узунской популяции видно из данных, приведенных в табл. 2. Особенно существенные изменения в числе и структуре хромосом зарегистрированы у животных с содержанием кадмия в крови в концентрации более 1 мкг/л. Корреляционный анализ свидетельствует о том, что имеется достоверная прямая зависимость между частотой клеток с цитогенетическими абберациями и концентрацией кадмия в крови у грызуна ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,01$ ). С частотой клеток с абберациями хромосомного типа такой закономерности не отмечено ( $r = 0,08$ ;  $p > 0,05$ ). Корреляционный анализ числа клеток с измененным числом хромосом и показателем концентрации в крови кадмия свидетельствует о том, что прямая зависимость имеется в отношении числа регистрируемых полиплоидных ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,01$ ) и гиперплоидных ( $r = 0,59$ ;  $p < 0,05$ ) клеток.

Таблица 1

**Число клеток костного мозга с хромосомными нарушениями  
у красных полевок, обитающих в окрестностях населенных пунктов  
Чаган-Узун и Турочак (контроль) Республики Алтай, %**

Регистрируемый показатель	с. Турочак (контроль)	с. Чаган-Узун
	n = 56	n = 68
Всего клеток с абберациями хромосом	2,7±0,6	12,1±1,4*
Число клеток с одиночными фрагментами	1,9±0,6	8,8±0,7*
Число клеток с хроматидными обменами,	0,5±0,2	0,7±0,2
Число клеток с двойными фрагментами	0,2±0,1	1,9±0,2*
Число клеток с хромосомными обменами	0,1±0,1	0,7±0,2**
Число клеток с гиперплоидным набором хромосом	0,2±0,1	1,9±0,3*
Число клеток с полиплоидным набором хромосом	0,1±0,1	0,8±0,2*
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями	3,0±0,5	14,5±1,8*

\*  $p < 0,01$  (Турочакская популяция).

\*\*  $p < 0,05$  (Турочакская популяция).

Таблица 2

**Число клеток костного мозга с цитогенетическими абберациями  
у красных полевок, отловленных в окрестностях с. Чаган-Узун,  
в зависимости от содержания в периферической крови животных кадмия, %**

Регистрируемый показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа
	n = 23	n = 21	n = 24
Число клеток с абберациями хроматидного типа	2,4±0,4	8,2±0,7*	12,0±0,8*
с абберациями хромосомного типа	0,7±0,3	1,6±0,5	2,8±0,7**
с гиперплоидным набором хромосом	0,2±0,1	2,6±0,5*	3,9±0,6*
с полиплоидным набором хромосом	0,1 ±0,1	0,8±0,3*	3,8±0,5*
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями	3,3±0,8	13,0±1,1*	22,7±1,2*

*Примечание.* Содержание в крови животных кадмия в следующих концентрациях: 1-я группа – менее 0,5; 2-я группа – от 0,5 до 1,0; 3-я группа – более 1,0.

\*  $p < 0,01$  (1-я группа).

\*\*  $p < 0,05$  (1-я группа).

Интегральная оценка состояния цитогенетического гомеостаза у животных, отловленных в окрестностях с. Чаган-Узун [15], свидетельствует, что критическое состояние хромосомного аппарата соматических клеток наблюдалось у 26,5% красных полевок. Таким образом, более четверти животных в данной местности имеют хромосомные нарушения, которые могут оказать влияние на жизнедеятельность и, в случае наличия аналогичных изменений в

генеративных клетках, на репродуктивную активность и возобновляемость популяции.

### Обсуждение результатов исследования

Полученные данные позволяют говорить о существовании в окружающей среде с. Чаган-Узун мутагенного фактора, способного вызвать у животных существенные цитогенетические аномалии. Корреляционный анализ свидетельствует о том, что высокая концентрация кадмия в крови может обусловить повышение некоторых цитогенетических показателей, в частности числа клеток с хроматидными абберациями. Тем не менее у 12,2% отловленных животных число клеток с хромосомными абберациями было на уровне контроля. Известно, что кадмий связывается в клетках с металлотионеинами [20–21]. По-видимому, существует генетически обусловленная активация генов, ответственных за продукцию металлотионеинов, и это у животных с определенным генотипом может способствовать толерантности к токсическому действию кадмия [22].

Одним из гипотетических механизмов, приводящих к появлению клеток с хромосомными нарушениями при интоксикации кадмием, является его способность лабильнолизировать мембраны лизосом, что может сопровождаться выходом нуклеаз, разрушающих структуру хромосом [4, 23–24]. Не исключено и непосредственное влияние кадмия на структуру хромосом за счет влияния на процессы биосинтеза ДНК [4, 25].

Полученные данные свидетельствуют, что наряду с хроматидными имеет место повышение числа хромосомных аббераций, среди которых наблюдались дицентрические хромосомы и кольца. Известно, что такие абберации характерны для радиационного воздействия [26]. Этому феномену возможны следующие объяснения. Горный Алтай, особенно его западная часть, где находится с. Чаган-Узун, неоднократно подвергалась радиоактивному воздействию в результате деятельности Семипалатинского атомного полигона. В то же время, поскольку последнее испытание на атомном полигоне произошло в 1962 г., за прошедший период окружающая среда практически полностью очистилась от этих последствий [27]. Не исключено также, что повышение числа клеток с хромосомными обменами связано с природным радиоактивным фоном из-за высокого содержания в горах Горного Алтая залежей урановых руд и, в связи с этим, повышенной эманацией радона в обследуемой местности [28].

### Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в костном мозге красных полевок (*Clethrionomys rutilus*), отловленных в районе с. Чаган-Узун Республики Алтай, расположенном в зоне геохимической провинции с высоким природным содержанием в окружающей среде кадмия, наблюдается высокий уровень цитогенетических нарушений. Результаты корреляционного анализа показывают, что имеется прямая зависимость между концентрацией в крови животных кадмия и уровнем некоторых типов цитогенетических нарушений. Тем не менее наличие среди цитогенетических нарушений двух-

ударных хромосомных aberrаций может свидетельствовать в пользу предположения о существовании среди мутагенных факторов в данной местности повышенного уровня ионизирующей радиации.

### Литература

1. *Ельчиновичева О.А.* Микроэлементы в наземных экосистемах Алтайской горной области: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Барнаул, 2009. 35 с.
2. *Воробьева Р.С.* Кадмий. М.: Наука, 1984. 148 с.
3. *Ершов Ю.А., Плетенева Т.В.* Механизмы токсического действия неорганических соединений. М.: Наука, 1989. 270 с.
4. *Михалева Л.М.* Кадмийзависимая патология человека // Архив патологии. 1988. Т. 50, № 9. С. 81–85.
5. *Чопикашвили Л.В., Скупневский С.В., Руруа Ф.К.* Сравнительное изучение тканевого распределения и мутагенной активности ионов кадмия и цинка с их цианидными комплексами // Генетика. 1981. Т. 27, № 2. С. 226–229.
6. *Гилева Э.А., Большаков В.Н., Косарева Н.Л., Габитова А.Т.* Частота хромосомных нарушений у синантропных домовых мышей как показатель генотоксического эффекта загрязнения среды // ДАН. 1992. Т. 325, № 2. С. 1058–1061.
7. *Гилева Э.А., Косарева Н.Л.* Уменьшение флуктуирующей асимметрии у домовых мышей на территориях, загрязненных химическими и радиоактивными мутагенами // Экология. 1994. № 3. С. 94–97.
8. *Гилева Э.А., Косарева Н.Л., Любашевский Н.М., Бахтиярова М.Ф.* Изменчивость частоты хромосомных нарушений, индуцированных антропогенными поллютантами, у домовой мыши из Гиссарской долины // Экология. 1993. № 1. С. 62–70.
9. *Гилева Э.А., Любашевский Н.М., Стариченко В.И. 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.
10. *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. 62–70.
11. *Померанцева М.Д., Рамаяя Л.К., Чехович А.В.* Генетические последствия аварии на Чернобыльской АЭС у домовых мышей (*Mus musculus*) // Генетика. 1996. Т. 32. С. 298–303.
12. *Ларина Н.И., Голикова В.Л., Лебедева Л.А.* Учебное пособие по методике полевых исследований экологии наземных позвоночных. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1981. 120 с.
13. *Орлов В.Н., Чудиновская Г.А., Крюкова Е.Н.* Исследование хромосомных наборов млекопитающих: Метод. руководство. М.: Наука, 1976. 36 с.
14. *Макгрегор Г., Варли Дж.* Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир, 1986. 256 с.
15. *Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И.* Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологич. политики России, 2000. 65 с.
16. *Гилева Э.А., Ракин С.Б., Чепраков М.И.* Геномная нестабильность у рыжей полевки: популяционно-экологические аспекты // Экология. 2006. № 4. С. 301–307.
17. *Тугарев А.А.* Влияние кадмия на морфофункциональные характеристики эритроцитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 22 с.
18. *Сендел Е.* Колориметрические методы определения следов металлов. М.: Наука, 1964. 672 с.
19. *SAS Institute Inc.* SAS/STAT™ User's Guide, Version 6, 1989. Cary NC. N.Y.: SAS Institute Inc., 1989. 324 p.
20. *Foulkes E.C.* On the mechanism of cellular cadmium uptake // Biol. Trace. Elem. Res. 1989. Vol. 21, № 4. P. 195–200.
21. *Min K.S., Ohyanagi N., Ohta M.* Effect of erythropoiesis on splenic cadmiummetallothionein level following an injection of CdCl<sub>2</sub> in mice // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1995. Vol. 134, № 2. P. 235–240.

22. Tanaka K., Min K.S., Onosaka S. The origin of metallothionein in red blood cells // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985. Vol. 78, № 1. P. 63–68.
23. Braeckman B., Brys K., Rzeznik U. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects // *Tissue and Cell.* 1999. Vol. 31, № 1. P. 45–52.
24. Al-Nasser Ibrahim A. Cadmium hepatotoxicity and alteration of the mitochondrial function // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2000. Vol. 38, № 4. P. 407–413.
25. Волкова Н.А., Карплюк И.А. Изучение мутагенной активности кадмия при пероральном поступлении // *Российский медицинский журнал.* 1990. № 5. С. 74–75.
26. Edwards A.A., Lloyd D.C., Prosser J.S. Chromosome aberrations in human lymphocytes: A radiobiological review. London: Academic Press, 1998. 432 p.
27. Ильинских Н.Н., Булатов В.И., Адам А.М. Радиационная экогенетика России. Томск: Изд. Сиб. мед. ун-та, 1998. 290 с.
28. Булатов В.И. Россия радиоактивная. Новосибирск: ЦЭРИС, 1996. 271 с.

*Поступила в редакцию 19.11.2010 г.*

**Nikolay N. Ilyinskikh, Svetlana A. Kozlova, Irina N. Ilyinskikh,  
Ekaterina N. Ilyinskikh, Alexander Yu. Yurkin**

*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

#### **CYTOGENETIC ABERRATIONS IN THE BONE MARROW OF RED-BACKED VOLES (*Clethrionomys rutilus* Pallas) LIVING IN AN AREA OF HIGH CADMIUM CONTENT, ALTAI REPUBLIC**

*It has studied a population of red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) caught in the vicinity of the settlement of Chagan-Uzun, Altai Republic, which located in a geochemical area of high cadmium content in the environment. It has been determined significantly high frequency of chromosomal aberrated cells in the bone marrow of the voles. About 87,8% of the voles caught nearby Chagan-Uzun have significantly high frequency of cells with chromatid acentric fragments, chromosomal aberrations as well as hyper- and polyploidy cells. Dicentric and ring chromosomes predominated among the chromosome aberrations. It was found that the frequency of chromosomal aberrant cells was positively correlated with the age of the animals. The correlation has not determined in the control vole population of Turochak. The highest frequency of chromosomal aberrations was found in a group Chagan-Uzun voles with cadmium blood concentration above 1 mkg/l. The high blood cadmium content may be a principal cause of cytogenetical aberrations in the animal. It has been found good positive correlations between the cadmium blood content and the frequency of some types of cytogenetic aberrations in the marrow cells of the animals. Integral estimation of cytogenetical homeostasis according to the Russian Ecological Politics Center in the Chagan-Uzun vole population was shown that about 26,5% of the population had critical state of cytogenetical apparatus. Thus, above 25% of the vole Chagan-Uzun population have chromosomal aberrations, which can have negative effects on generative cells and reproduction.*

**Key words:** *geochemical area; cadmium; Altai Republic; red-backed vole; bone marrow; chromosome aberrations.*

*Received November 19, 2010*