

## ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ ОКРАШИВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ КРОВИ НА ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ ТРЁХПОРОДНЫХ КРОССОВ КРОЛИКА

К.В. Жилина, И.В. Петрова, Л.Е. Гришина, А.Н. Семикрасова, Г.Ю. Косовский

ФГБНУ НИИПЗК,

e-mail: [niipzk@mail.ru](mailto:niipzk@mail.ru)

Кролиководство – отрасль животноводства, которая имеет большие потенциальные возможности наращивания темпов производства и увеличения объемов выпуска относительно дешевого мяса в короткие сроки. Эффективность животноводства в существенной степени зависит от генетического благополучия племенных животных. По результатам многих исследований, нарушение воспроизводительной функции животных сельскохозяйственных видов, а также смертность новорожденных в настоящее время являются основными проблемами дальнейшего повышения продуктивности животноводства. Существенный вклад в такие негативные явления вносит нестабильность генетического аппарата производителей, которая может иметь как генетическую, так и паратипическую обусловленность.

Первые исследования мутационных спектров в соматических клетках и цитогенетических исследованиях были начаты в 20 веке. В 1973 году Шмидтом был предложен микроядерный тест. Этот тест, основанный на подсчете числа клеток с микроядрами, которые являются показателем воздействия на организм генотоксических факторов внешней среды, является одним из информативных и быстрых методов исследования цитогенетических повреждений. Для этих целей используются эритроциты или другие высокоспециализированные клетки живых организмов. Техника проведения микроядерного теста у кроликов мало изучена, в связи с чем авторами была поставлена задача провести сравнительный анализ эффективности разных способов окраски мазков крови для выявления микроядер в эритроцитах.

Ключевые слова: микроядра, эритроцит, кролик, краситель

Микроядро — фрагмент ядра эукариотической клетки, не содержащий полного генома, необходимого для её выживания. Является патологической структурой и может наблюдаться в клетках любых тканей. Обычно микроядра образуются в результате неправильного хода клеточного деления или фрагментации ядра в процессе апоптоза [1].

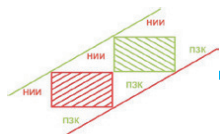
Микроядра образуются из фрагментов хромосом, которые лишены центромер и поэтому исключаются из клеточных ядер в момент деления клеток. Кроме того, они могут образовываться из хромосом, оставшихся в анафазе.

К преимуществам микроядерного теста следует отнести быстроту, надёжность, а также то, что тестирование можно проводить в тканях с низкой митотической активностью.

Накоплены данные о том, что повышенный уровень частоты встречаемости клеток с цитогенетическими аномалиями в периферической крови статистически достоверно коррелирует с количеством морфологически дефектных

сперматозоидов, с репродуктивными нарушениями и может служить основанием для прогноза повышенной вероятности снижения воспроизводительных функций. Регистрация эритроцитов периферической крови с микроядрами может служить показателем физиологического состояния организма и потенциальной генотоксичности внешней среды [2].

В настоящее время микроядерный тест включен как обязательный при токсикологических исследованиях, особенно в промышленном рыбоводстве. Данный метод широко применяется при оценке гомеостаза организма [3]. Подобные исследования в области сельского хозяйства, в частности кролиководства, в научной литературе слабо освещены. В то же время регистрация эритроцитов периферической крови с микроядрами может служить показателем физиологического состояния организма, оценка общей нестабильности генетического аппарата необходима для прогноза репродуктивного успеха, что имеет особую важность в кролиководстве.



**Цель исследований** подобрать оптимальный способ окраски эритроцитов в мазке периферической крови кроликов трёхпородного кросса для проведения микроядерного теста.

### Материалы и методы

Работа проведена в ФГБНУ НИИПЗК. Объектом исследования служили кролики нового трёхпородного кросса. Для анализа возможных половых различий по частоте эритроцитов с микроядрами материал для анализа брали от 5 самок и 5 самцов.

Для приготовления препаратов кровь брали из краевой ушной вены, наносили на чистое, обезжиренное сухое предметное стекло, делали мазок. Высушенные препараты окрашивали разными красителями по различным методикам:

1 – по Романовскому-Гимза: мазок фиксировали метанолом, высушивали и укладывали стекло мазком вниз на стеклянный мостик в кювету с рабочим раствором Романовского-Гимза (1 капля готового красителя на 1 мл дистиллированной воды) на 25 минут. Затем препарат промывали дистиллированной водой и высушивали в вертикальном положении.

2 – по Май-Грюнвальду 1 способ: нефиксированный мазок заливали готовым красителем и через 5 минут промывали дистиллированной водой. Готовые препараты высушивали на воздухе в вертикальном положении.

3 – по Май-Грюнвальду 2 способ: нефиксированный мазок заливали готовым красителем, через 3 минуты добавляли дистиллированную воду, выдерживали еще 10 минут и промывали дистиллированной водой. Готовые препараты высушивали на воздухе в вертикальном положении.

4 – по Паппенгейму: нефиксированный мазок помещали в кювету с раствором Май-Грюнвальда на 3 минуты, затем промывали дистиллированной водой и помещали в кювету с рабочим раствором Романовского-Гимза на 25 минут. После окрашивания препараты промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе в вертикальном положении.

5 – метиленовым синим: спиртовой раствор метиленового синего наносили на фиксированный метанолом препарат на 5 минут, сливали краситель и подсушивали на воздухе.

6 – по методу Филипсона: на нефиксированный мазок наносили 20 капель спиртового раствора краски (фабричный раствор Романовского-Гимза разбавляли 96%-м этанолом 1:4). Через 5 минут к краске на мазке добавляли 20 капель дистиллированной воды. Мазки через 20 минут промывали водой и высушивали.

7 – по Нохту: на фиксированный мазок наливали рабочий раствор азур-эозина, выдерживали 20-30 минут, промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Препараты анализировали на микроскопе Nikon под иммерсией при увеличении  $100\times 10$ . Было просмотрено 70 препаратов (по 10 для каждого красителя), на каждом подсчитывали не менее 3 000 клеток и вычисляли частоту встречаемости эритроцитов с микроядрами как отношение числа клеток с микроядрами к общему числу проанализированных клеток (в %). Результаты исследований обработаны статистически при помощи программы Microsoft Excel.

### Результаты исследований

При окраске по Май-Грюнвальду (1 и 2 способ), Романовскому-Гимза, получают однородно окрашенные препараты, на которых ядерный аппарат по окраске отличается от цитоплазмы, клетка имеет четкие границы. При окраске по Паппенгейму препараты более чистые и четкие, микроядра ярче, легче воспринимается глазом (Рисунок)

При окрашивании по Нохту и метиленовым синим препараты получаются очень бледные, микроядра плохо просматриваются. При окрашивании по Филипсону границы эритроцитов не четкие, препарат плохо читаемый.

В результате проведенных исследований в эритроцитах периферической крови кроликов при разных способах окраски обнаружены клетки с микроядрами (Таблица).

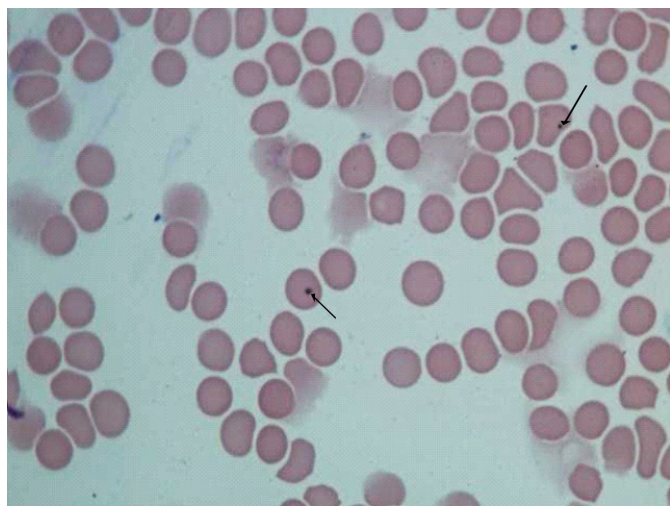
При окраске по Романовскому-Гимза уровень эритроцитов с микроядрами у разных особей варьировался от 2,1 до 6,1% при среднем значении  $4,15 \pm 0,47\%$ . При окраске по Май-Грюнвальду (1 способ) количество эритроцитов с абберацией колебалось от 2,1 до 5,5% при средней величине исследуемого показателя  $3,58 \pm 0,41\%$ . При окраске по Май-Грюнвальду

по 2 способу значения колебались в пределах от 1,7 до 5,1%. При окраске мазков крови по Паппенгейму концентрация микроядер в эритроцитах была от 2,2 до 7,5%, при среднем значении  $4,51 \pm 0,56\%$ .

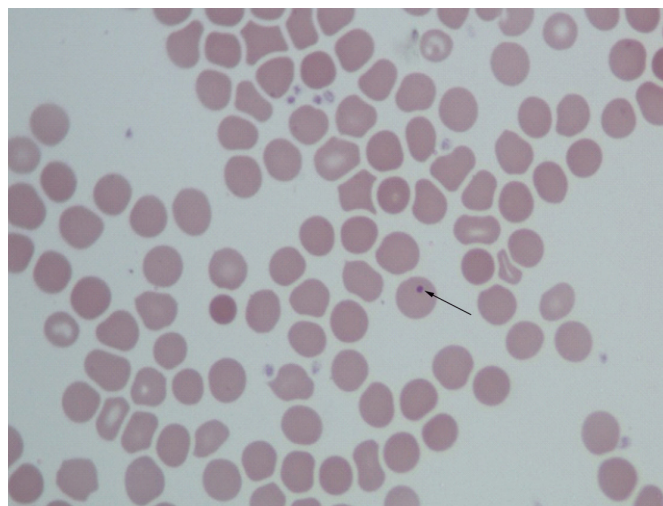
При проведении сравнительного анализа полученных результатов, статистически достоверных различий не выявлено.

### Заключение

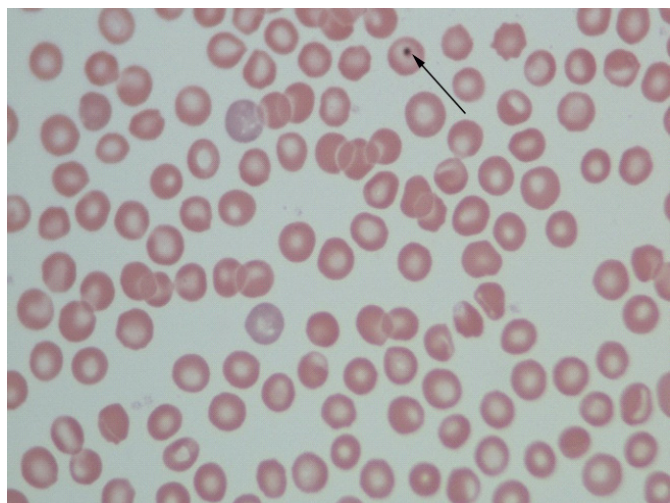
Таким образом, сравнив полученные данные, для проведения микроядерного теста у кроликов можно рекомендовать метод окрашивания по Паппенгейму, т.к. препарат получается более четкий, хорошо читаемый. Способы окраски по Май-Грюнвальду можно рекомендовать, как экспресс-метод, позволяющий получить хороший результат в считанные минуты.



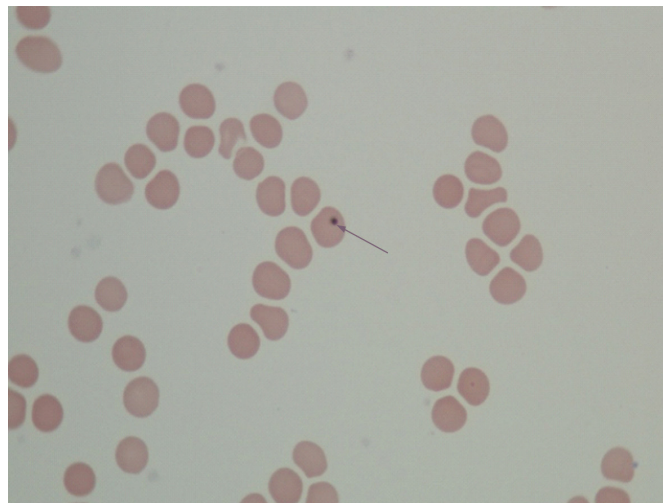
а



б



в



г

Рисунок. Микроскопия мазков крови трехпородного кросса кроликов, увеличение  $10 \times 100$  (стрелками указаны микроядра)

а – окраска по Май-Грюнвальду (1 способ), б – окраска по Май-Грюнвальду (2 способ), в – окраска по Романовскому-Гимза, г – окраска по Паппенгейму.

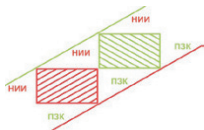


Таблица. Частота встречаемости микроядер в эритроцитах, %.

	Методы окраски			
	по Романовскому-Гимза	по Май-Грюнвальду, способ 1	по Май-Грюнвальду, способ 2	по Паппенгейму
1	6,1	4,2	4,3	7,5
2	5,8	5,5	5,1	6,2
3	3,2	2,8	2,7	3,4
4	2,6	2,2	2,3	2,7
5	3,5	3,3	3,1	3,7
6	5,6	4,5	4,9	5,8
7	2,1	1,9	1,7	2,2
8	2,8	2,1	2,3	3,1
9	4,3	4,1	3,9	4,6
10	5,5	5,2	4,9	5,9

### Список литературы

1. Косовский Г.Ю. Клеточные и геномные технологии в повышении эффективности животноводства. М., 2014

2. Глазко Т.Т., Косовский Г.Ю., Глазко В.И. Биомаркеры геномной нестабильности у животных сельскохозяйственных видов. Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2013;2:139-147.

3. Калаев В.Н., Игнатова И.В., Климова Н.В. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в крови перепела японского (*Coturnix Japonica*) при разных способах. Фундаментальные исследования. 2013;10(4):770-775.

### FREQUENCY OF THE MICRONUCLEI OCCURRENCE IN THE ERYTHROCYTES OF THE THREE-BRED RABBIT CROSS AT DIFFERENT STAINING TECHNIQUES

K.V. Zhilina, I.V. Petrova, L.E. Grishina, A.N. Semikrasova, G.Yu. Kosovsky

FSFRI RIFBARB

e-mail: [niipzk@mail.ru](mailto:niipzk@mail.ru)

Rabbit breeding is a branch of the animal breeding with high opportunities for rapid increase in production rate and amount relatively cheap meat. The effectiveness of the animal breeding depends essentially on the genetic welfare of the pedigree animals. The results of the abundant investigations tell that the impairment of the reproductive function of the agricultural animals the along with the neonatal mortality are the main challenges in the further improvement of the animal breeding pro-

ductivity. The genetic instability of the stud animals both of genetic and of paratyptic origin makes a great contribution in these negative phenomena.

The first investigations of the mutation spectra in the somatic cells and cytogenetic examinations were performed in the 20-th century. In 1973 W. Schmid proposed a micronucleus test. The test is one of the informative and prompt methods for examination of cytogenetic damages. It is based on the estimation of numbers of the cells containing micronuclei, which are the indicator of environmental genotoxic factors impact. The test involves the erythrocytes or some other highly specialized cells of a live organism. Techniques of micronucleus testing in rabbits is underinvestigated, so the main aim of the authors was a comparative analysis of the effectiveness of various staining techniques for blood smears to reveal the micronuclei in the erythrocytes.

Keywords: micronuclei, erythrocyte, rabbit, stain

## References

1. Kosovskiy G.Yu. Cell and genomic technologies in improvement of animal breeding effectiveness. Moscow. 2014
2. Glazko T.T., Kosovskiy G.Yu., Glazko V.I. Biomarkers of genomic instability of farm animals. Proceedings of the Timirazev Agricultural Academy [Izvestia Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii]. 2013;2:139-147.
3. Kalaev V.N., Ignatova I.V., Klimova N.V. The frequency of erythrocytes with micronuclei in the blood of Japanese quail (*Coturnix japonica*) at different ways of coloring. Fundamental investigations [Fundamental'nye issledovaniya]. 2013; 10(4):770-775.

### АНОНСЫ АУКЦИОНЫ

#### SAGAFURS:

ДЕКАБРЬ 2019

Осмотр товаров 17.12.2019 - 18.12.2019

Торги 19.12.2019 - 20.12.2019

МАРТ 2020

Осмотр товаров 27.02.2020 - 02.03.2020

Торги 03.03.2020 - 09.03.2020

Подробности на сайте <https://www.sagafurs.com/auction/>

#### NAFA

МАРТ 2020 13.03 - 18.03.

ИЮЛЬ 2020 6.07. - 10.07.

Подробности на сайте [https://www.nafa.ca/webcenter/portal/Auction/pages\\_auction/auctionhome](https://www.nafa.ca/webcenter/portal/Auction/pages_auction/auctionhome)

#### Международная ярмарка меха и изделий из меха, Гон-Конг

25 – 28 февраля 2020

Подробности на сайте <http://www.hkff.org/furFair.php?lang=1>

#### Международная выставка изделий из кожи и меха

Милан, 20-23 февраля, 2020 Подробности на сайте [http://www.mifur.com/index\\_eng.asp](http://www.mifur.com/index_eng.asp)

#### НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ КОНФЕРЕНЦИИ

III межрегиональная научно-практическая конференция: «От биопродуктов к биоэкономике», состоится 7-8 ноября 2019 г. в Алтайском государственном университете. Контактная информация: Бахарева Яся Ярославовна, тел.: +7 (3852) 65-94-30, эл. почта: [pharm22@bk.ru](mailto:pharm22@bk.ru)

Мини-конференция «Хромосомы и митоз», состоится 21 ноября 2019 года в Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск. Для регистрации необходимо прислать письмо по электронной почте на адрес [conference@mcb.nsc.ru](mailto:conference@mcb.nsc.ru) координатор конференции – Мария Графодатская

21-22 ноября 2019 г. состоится международная учебно-методическая и научно-практическая конференция "Актуальные вопросы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии", посвященная 100-летию со дня основания МВА имени К.И. Скрябина, Адрес оргкомитета: E-mail: [rector@mgavm.ru](mailto:rector@mgavm.ru), [sci@mgavm.ru](mailto:sci@mgavm.ru); тел. 8(495) 377-63-50; 8(495) 377-67-46

Международная научная конференция молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» состоится 28 - 29 ноября 2019 года в г. Алматы. Полная информация представлена на сайте Института молекулярной биологии и биохимии им М.А. Айтхожина <http://imbb.org.kz/2019/03/14/konferenciya/>

28 ноября 2019 года, в гостинице «Космос», г. Москва, состоится сельскохозяйственная конференция «Механизмы увеличения прибыли на аграрном рынке. Ручное управление». Основной целью организатора, является обеспечение неформального диалога между участниками аграрного рынка. Получить более подробную информацию и зарегистрироваться для участия в конференции можно на сайте конференции [агроко-консалтинг.рф](http://агроко-консалтинг.рф).

\*

\*

\*

\*