

## ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ рРНК У ЯДЕРЦЕВИХ ОРГАНІЗАТОРАХ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ КРОЛІВ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

<sup>1</sup>Дзіцюк В, доктор с.-г. наук

<sup>2</sup>Бойко О., кандидат с.-г. наук

<sup>2</sup>Гончар О., кандидат с.-г. наук

<sup>2</sup>Гавриш О., кандидат с.-г. наук

<sup>3,4</sup>Гузеватий О., кандидат біолог. наук

<sup>1</sup> Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН  
valentyunadziusiuk@gmail.com <https://orcid.org/0000-0001-9697-4165>

<sup>2</sup>Черкаська дослідна станція біоресурсів НААН, [bioresurs.ck@ukr.net](mailto:bioresurs.ck@ukr.net)

<sup>3</sup>Інститут тваринництва степових районів імені М.Ф. Іванова “Асканія-Нова” – Національний науковий селекційно-генетичний центр з вівчарства

<sup>4</sup>Національна академія аграрних наук

*Вивчення ядерцевих організаторів тварин дає можливість оцінити рівень функціональної активності рибосомальних генів 18S/28S, які беруть участь у біосинтезі білка. Метою роботи було дослідження ознак активності ядерця у інтерфазних клітинах крові кролів різних порід української селекції.*

*У експерименті використали самок кролів 4-місячного віку порід полтавське срібло (n=30), каліфорнійська (n=25) їх гібридів (n=21). Зони ядерця у інтактних лімфоцитах крові досліджували за методом Howellend Black (1980). Препарати фарбували розчином 50% AgNO<sub>3</sub> з додаванням 1- % розчину мурашиної кислоти і інкубували у вологій камері за температури +60° С. Мікроскопування проводили за допомогою мікроскопа «ZEISS, Germany» (збільшення 10×100). У кожній тварини досліджували щонайменше 200 інтерфазних клітин. Активність ядерця оцінювали за параметрами: середня кількість ядерця у ядрі (пЯО), сумарна площа ядерця в ядрі (ΣS<sub>Яо</sub>, мкм<sup>2</sup>), частка площі ядерця у площі ядра лімфоцита (чΣS<sub>Яо</sub>, %). Статистичний аналіз здійснювали за стандартними програмами варіаційної статистики, що входить у пакет програм «STATISTICA» (2020).*

*Середнє число ядерця на клітину варіювалось від – 1,70±0,08 у кролів каліфорнійської породи до 5,90±0,29 у гібридних тварин. Виявлена статистично значуща різниця (p<0,05) між дослідними групами чистопородних і гібридних кролів. Коефіцієнт варіації показника середньої кількості ядерця на клітину знаходився на середньому рівні мінливості: 20,58% у кролів породи полтавське срібло, 19,50%, у каліфорнійської породи і*

16,49% у гібридних. Сумарна площа ядра у клітині у всіх дослідних тварин варіювала від 5 мкм<sup>2</sup> у однієї з особин каліфорнійської породи до 12 мкм<sup>2</sup> у особини гібридного походження. Частка площі ядра від площі ядра у кролів породи полтавське срібло, каліфорнійська і гібридів склала 26,10±1,80%, 24,30±1,62 і 29,40±2,50 відповідно.

Кореляційний аналіз виявив статистично достовірний зв'язок між числом ядер у клітині та сумарною площею ядра в ядрі клітини ( $r=0,54$ ,  $p<0,01$ ) та між числом ядер у клітині та часткою площі ядра від площі ядра ( $r=0,28$ ,  $p<0,05$ ) у кролів породи полтавське срібло.

Встановлено поліморфізм за дослідженими параметрами активності ядер у інтактних лімфоцитах периферійної крові кролів порід полтавське срібло, каліфорнійська і гібридів.

Доведено існування статистично значущої різниці між дослідними групами чистопородних і гібридних кролів за кількістю ядер у клітині, сумарною площею ядер у клітині і часткою ядра від площі ядра лімфоцита.

Результати порівняльного аналізу досліджених параметрів активності ядер у лімфоцитах периферійної крові кролів порід полтавське срібло, каліфорнійської і гібридів вказують на більш високу активність ядер у тварин гібридного походження.

**Ключові слова:** ядра, ядро лімфоцита, гени рРНК, Ag-banding, кролі

**Актуальність.** Кріль домашній (*Orycto laguscunicu lus domesticus*) вважається цінним сільськогосподарським видом завдяки високоякісному дієтичному м'ясу, високій продуктивності та скороспілості. Food and Agriculture Organization (FAO) виділяє кроля домашнього як одного із видів ссавців «золотої п'ятірки», які є основою аграрної цивілізації (FAO, 2015). У різних країнах світу нараховується близько 200 порід і 500 породних груп кролів, які значно різняться за напрямом продуктивності та умовами розведення (Carneiro et al., 2011).

Кролівництво в Україні, як і в усьому у світі, наразі демонструє активні темпи розвитку. Прогнози експертів свідчать про зростання виробництва крільчатини з очікуваним щорічним приростом обсягу близько +2% (до 2 млн т до 2025 року).

Досягнення цих цілей потребує впровадження сучасних методів управління генетичними ресурсами кролів, що ґрунтуються на новітніх підходах до дослідження їх генетичної структури. Пріоритетними напрямом генетики, що використовується для розробки генетично обґрунтованих селекційних програм і збереження генофонду сільськогосподарських тварин, є застосування молекулярних технологій. Це включає селекцію за допомогою

молекулярно-генетичних маркерів (MAS), маркування генів, що контролюють кількісні кількісних ознаки (QTL) та інші методи. Водночас для вивчення механізмів та шляхів регуляції структурно-функціональної мінливості геному застосовуються цитогенетичні дослідження, які поглиблюють знання про роль структурної організації ДНК у функціонуванні геному. Цитогенетичне дослідження окремих структур клітинного ядра, зокрема морфофункціонального стану його ділянок, що містять ядерця, відіграє важливу роль у розумінні процесів синтезу ДНК і РНК та взаємодії ДНК з і білками ядерного матриксу (Britton-Davidian et al., 2012; Hirai H. 2020; Montiel et al., 2022).

Ядерця є структурними елементами клітинного ядра, які називають «фабрикою рибосом» (Bersaglieri, Santoro, R, 2019). Весь матеріал ядерця – це похідне ядерцевого організатора. Завдяки використанню методу гібридизації *insitu* показано, що ядерцевий організатор являє собою ділянку хромосоми, що містить кластери рибосомальних генів для 18S, 5,8S і 28S РНК. Кластери рДНК займають певні райони в деяких хромосомах каріотипу, які отримали назву «ядерцеорганізуючих хромосом» (ЯО-хромосом), а ділянки хромосом, на яких локалізовані рибосомальні гени, – «ядерцевих організаторів або ядерцеорганізуючих районів хромосом» (ЯОР, Nucleolusorganizerregions (NORs) (Cockrell, 2022; Hori et al., 2023). Ядерце є динамічною органелою, структура якого відображає процеси, пов'язані із біогенезом рибосом. Його розміри і складові компоненти змінюються залежно від активності клітини і стадії мітотичного циклу. Ядерце добре візуалізується у ядрі клітини на стадії інтерфази. У динаміці клітинного циклу у його структурі відбуваються зміни і воно зникає, тобто переходить у цитоплазму. Але його матеріал, асоційований із регуляторними кислими білками, зберігається і перерозподіляється між кластерами рДНК. Починаючи з телофази ядерця відновлюються і скупчуються навколо спеціалізованих ділянок у хромосомах – районів ядерцевих організаторів (Nucleolus Organizer Regions (NOR), (Srikulnath et al., 2009, McStay. 2016). Особливістю цих ділянок є їх асоціація із кислими негістоновими білками (C23, B23, UBFі РНК-полімеразою), які є аргентофільними і мають здатність забарвлюватись азотнокислим сріблом (AgNO<sub>3</sub>) (Pich et al 1995; Ahmad et al., 2019).

Диференційне фарбування азотнокислим сріблом (AgNO<sub>3</sub>) (*Ag-banding*) дозволяє візуалізувати райони організаторів ядерця, але складність отримання препаратів хромосом робить цей метод не дуже практичним.

Натомість дослідники (Wang, Lemos, 2017; Iolchiev et al., 2022) запропонували метод оцінки активності ядерцевого апарату у інтактних клітинах лімфоцитарного ряду, зокрема в лейкоцитах. Цей метод став можливим завдяки глибокому вивченню структури і функцій лейкоцитів. Ці

клітини, маючи ядро, є одними з найскладніших і функціонально активних у крові ссавців. Вони сприймають сигнали про будь-які зміни гомеостазу, адаптуючи свою активність для підтримання біологічної рівноваги (Sirri, 2000). Цей принцип лежить в основі реакції імунної системи, роблячи лейкоцити індикаторами стану організму в цілому (Andraszek et al., 2009).

Згідно з дослідженнями Oka et al (2015) збільшення площі ядерця у ядрі лімфоцита свідчить про підвищення активності ядерця та інтенсивності синтезу рРНК. Цю залежність підтверджують інші дослідники (McStay, 2016; Pena et al., 2017), стверджуючи, що структура і кількість ядерцевих організаторів динамічно змінюється залежно від потреби клітин в синтезі рибосомальної РНК.

Цей зв'язок робить багатообіцяючим використання показників активності ядерцевих організаторів для характеристики фізіологічного стану тварин та, в перспективі, для оцінки їх господарсько корисних ознак (King et al., 1988).

У кроля домашнього (*Oryctolagus cuniculus domesticus*), як і в інших видів тварин, ядерцеві організатори досліджувались у метафазних хромосомах (Martin-DeLeon, 1980; Monteagudo, Arruga, 1991). Хоча ці дослідження дають уявлення про кількість і хромосомну локалізацію ядерцевих організаторів, все ж вони не дають достатньої інформації для практичного застосування знань про активність і зв'язок параметрів структури ядерцевого апарату з фізіологічними і продуктивними характеристиками сільськогосподарських тварин.

**Мета роботи.** Дослідження активності ядерць у інтактних лімфоцитах у чистопородних і гібридних кролів різних порід української селекції.

**Матеріали і методи.** Дослідження виконані у відділі генетики і біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН та у лабораторії генетики Черкаської станції біоресурсів НААН.

Для дослідження активності ядерць у інтактних лімфоцитах крові були відібрані зразки крові у самок кролів у 4-5 місячного віку порід полтавське срібло (30 гол.), каліфорнійська (25 гол.) та їх гібридів (21 гол.). Кров кролів відбирали пункцією вушної вени вранці перед годівлею у пробірки з антикоагулянтом (S-Monovette, Germany).

Дослідження зон ядерць у лімфоцитах проводили на мазках периферійної крові, зафіксованих метиловим спиртом. Фарбування інтерфазних лімфоцитів здійснювали за методом Howell and Black (1980). На препарат наносили 150 мкл 50-% розчину азотнокислого срібла і 100 мкл 1-% розчину мурашиної кислоти, потім інкубували у вологій камері термостата за температури +60°C протягом 40-60 хвилин. Після промивання препарату дистильованою водою його проводили по спиртах і дофарбовували 1%-ним

розчином барвника Гімза. Пофарбовані препарати аналізували за допомогою мікроскопа «ZEISS» (Німеччина) за збільшення  $10\times 100$ . Ядра після фарбування було легко ідентифікувати: вони були забарвлені у жовтий колір, а ядерця – у темно-коричневий колір. У кожній тварини дослідили не менше 200 інтерфазних клітин.

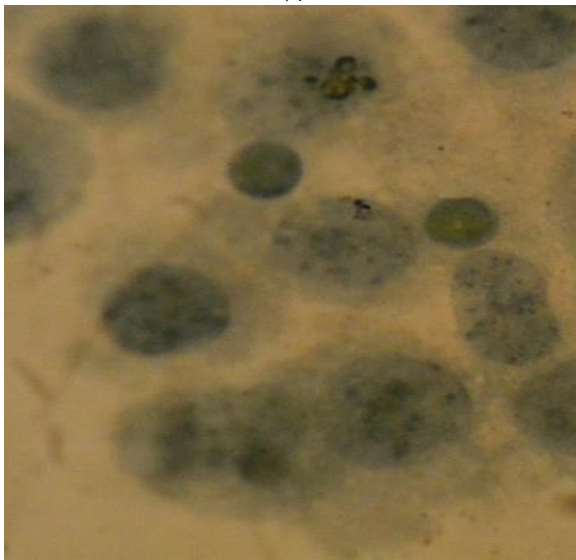
Для аналізу функціональної активності ядерець в інтерфазних ядрах враховували середню кількість ядерець у ядрі (nЯО), їх сумарну площу в ядрі ( $\Sigma S_{\text{ЯО}}$ , мкм), частку площі ядерець від площі ядра лімфоцита ( $\text{ч}\Sigma S_{\text{ЯО}}$ , %). Площу ядерець і ядер лімфоцитів вимірювали з використанням окуляр-мікрометра WF10X.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за стандартними програмами варіаційної статистики, що входять до пакету програм «STATISTICA» (version 14.00.15., 2020).

**Результати досліджень.** В результаті проведеного дослідження встановлено, що у популяції лімфоцитів периферійної крові кроликів після фарбування препаратів азотнокислим сріблом виявляються два типи клітин: лімфоцити, що перебувають у стані спокою і не мають чітко виражених ядерцевих структур, та лімфоцити з активними ядерцями (рис.1). На рисунку в лімфоцитах чітко видно забарвлені сріблом структури, які, на нашу думку, відповідають ядерцевим організаторам у хромосомах, стимульованих мітогеном. Кількість активних ядерець на клітину варіювалась від 1 до 9. Водночас спостерігалось, що розміри і інтенсивність забарвлених ядерець у інтерфазних лімфоцитах різняться.

Відомо, що білки транскрипційного комплексу ядерцевих організаторів у мітотичних хромосомах здатні зафарбовуватись азотнокислим сріблом. Отримані нами дані свідчать про те, що ці білки присутні в інтерфазних лімфоцитах периферійної крові. Це робить метод фарбування азотнокислим сріблом перспективним для візуалізації активних ядерцевих структур у лімфоцитах, підрахунку кількості ядерець у кожному лімфоциті і вимірювання площі активних ядерних структур, що дає інформацію про їх активність.

Основні характеристики ядерець у лімфоцитах кролів досліджуваних груп представлені у таблиці. Встановлено, що середня кількість ядерець на клітину варіювалась від  $-1,70\pm 0,08$  у групі кролів каліфорнійської породи до  $5,90\pm 0,29$  у групі гібридних тварин. Найбільш поширеними були клітини з трьома ядерцями. Достовірної різниці в середній кількості ядерець на клітину між дослідними групами кролів порід полтавське срібло і каліфорнійська не виявлено. Натомість середнє значення кількості ядерець у дослідній групі кролів гібридного походження статистично значущо переважало аналогічний параметр чистопородних тварин обох інших груп ( $p < 0,05$ ).



***Рис. 1 Лімфоцити периферійної крові кролика, що містять ядерця. Забарвлення азотнокислим сріблом. Збільшення: об.  $\times 100$ ; ок.  $\times 10$ .***

Величина коефіцієнтів варіації свідчить про середній рівень мінливості показника кількості ядерць на клітину у трьох дослідних групах і коливається від 16,49% у гібридних кролів до 20,58 % у кролів породи полтавське срібло, з проміжним значенням 19,50% у кролів каліфорнійської породи.

Згідно з даними, представленими на рисунку 2, характер розподілу кількості ядерць у кролів досліджуваних груп значною мірою співпадає. Модальне число кількості ядерць на клітину знаходиться в діапазоні 2,0-2,9 (рис.2).

Водночас спостерігаються відмінності між групами, зумовлені наявністю різної кількості активних клітин, що, в свою чергу, свідчить про інтенсивність процесів синтезу рРНК в клітинах.

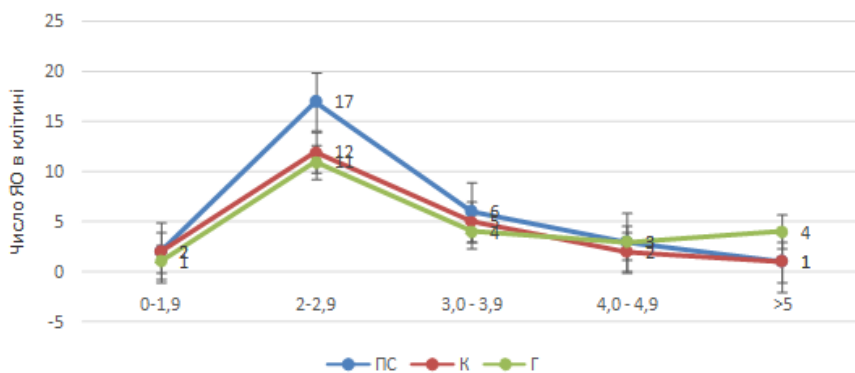
Дослідження показало, що тварини гібридного походження статистично значущо ( $p < 0,05$ ) переважають за кількістю клітин з активними ядерцями тварин інших дослідних груп – чистопородних кролів порід полтавське срібло і каліфорнійська.

Схеми міжпородного схрещування відіграють важливу роль у програмах розведення кролів, адже вони дозволяють оцінити ефективність комбінації генів, що відповідають за реалізацію бажаних продуктивних ознак (Saadey et al., 2008). Відомо, що схрещування кролів різних порід може призвести до покращення продуктивних ознак у потомства порівняно з батьківськими породами (явище гетерозису). Однак, важливо враховувати, що схрещування

також може дати непередбачувані результати, і не гарантує, що потомство матиме всі бажані продуктивні ознаки.

У досліджених нами кролях міжпородного гібридного походження було виявлено вищі значення параметрів, які характеризують активність ядерця. Це, в свою чергу, свідчить про вищий рівень синтезу РНК в клітинах і, відповідно, кращі обмінні процеси в організмі. Це може вказувати на потенційну вищу продуктивність тварин.

Chen et al. (1998) запропонували гіпотезу, яка пояснює домінування ядерця у міжвидових гібридних тварин. Вони вважають, що даний феномен спричинюється пригніченням генів рРНК одного виду іншим, що призводить змін у метилюванні ДНК і модифікації гістонів (Pontvianne, 2012). Домінування ядерця епігенетичне і в гібридів експресія генів рРНК відбувається тільки в одного із батьків (Chen et al., 1998).



**Рис. 2. Розподіл частоти ЯО у інтерфазних лімфоцитах різних порід кролів**

Схожа картина спостерігається і у аналізі дослідних груп кролів за показниками «сумарна площа ядерця в ядрі» і «частка площі ядерця від площі ядра». Показник сумарної площі ядерцевь клітині усіх дослідних тварин виявився досить мінливим, варіюючи від 5 мкм<sup>2</sup> у однієї з особин каліфорнійської породи до 12 мкм<sup>2</sup> у особини гібридного походження. (таблиця 1).

Параметр «частка площі ядерця від площі ядра» свідчить про те, що ядерця займають близько третини площі ядра лімфоцита. Цей показник коливався від 26,1% у кролів породи полтавське срібло до 29,4% у гібридних кролів.

**Таблиця 1. Середня кількість ядерць на клітину, сумарна площа ядерць в ядрі та частка площі ядерця від площі ядра лімфоцита**

Параметри вимірювання	Порода		
	Полтавське срібло	каліфорнійська	Гібриди
n	30	25	21
Середня кількість ядерць на клітину, n	2,97±0,48	2,85±0,50	3,51±0,68
Сумарна площа ядерць в ядрі, мкм <sup>2</sup>	8,70±1,40	8,32±1,98	9,33±1,90
Частка площі ЯО від площі ядра, %	26,10±1,80	24,30±1,62	29,40±2,50

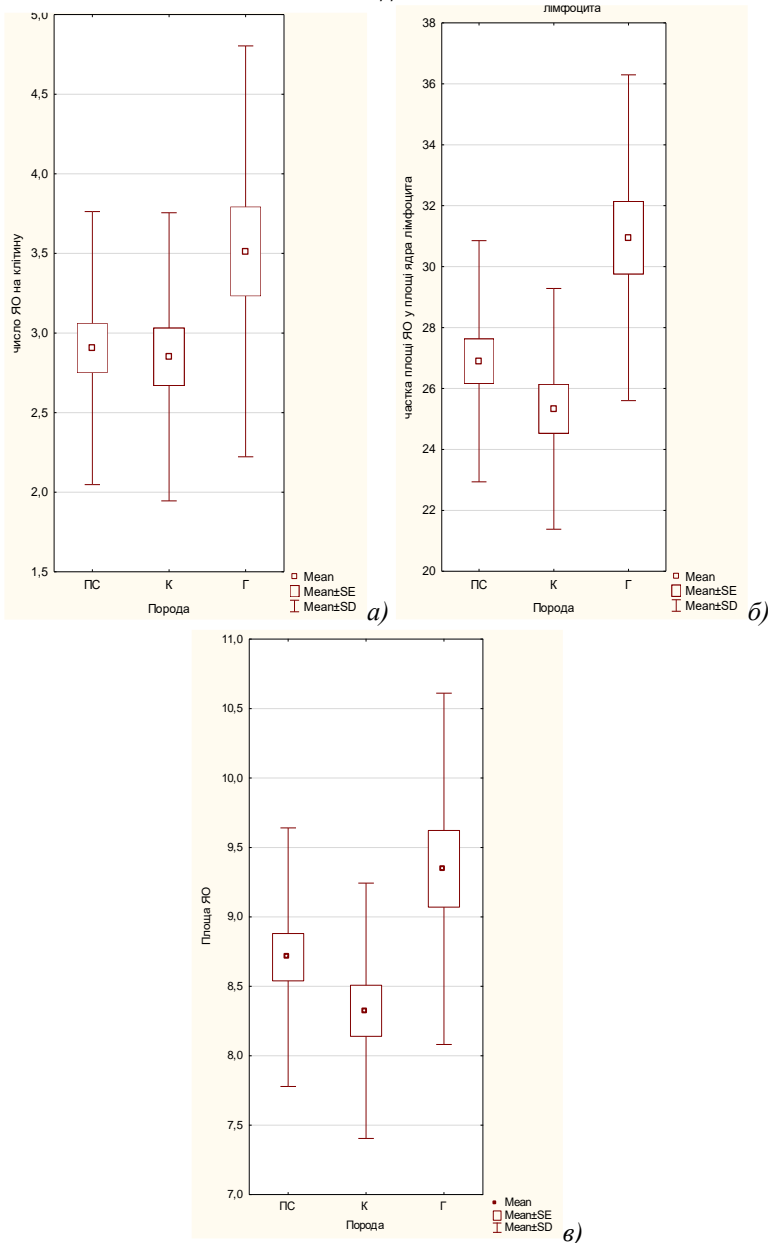
У групі кролів гібридного походження встановлено достовірно вищі значення параметрів ядерць порівняно з дослідженими групами чистопородних кролів порід полтавське срібло і каліфорнійська. Це стосується середньої кількості ядерць ( $p < 0,05$ ), сумарної площі ядерць ( $p < 0,05$ ) та середньої частки площі ядерця від площі ядра ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

Не спостерігалось статистично значущих відмінностей за середніми значеннями кількості, сумарної площі ядерць та частки площі ядерця від площі ядра лімфоцита між дослідженими групами чистопородних тварин.

Ці результати узгоджуються з даними Oznurlu et al (2009), які виявили, що кількість ядерць, їх абсолютна і відносна площі були вищими у ангорських кролів порівняно з новозеландськими кроликами. Дослідники також спостерігали позитивну кореляцію між кількістю активних ядерць щільністю волокон у ангорських кроликів, які мають високу продуктивність вовни.

Проведений аналіз ознак, що характеризують стан ядерць у досліджених груп кролів, може свідчити про існування певного зв'язку між ними. Для перевірки цього припущення були розраховані коефіцієнти кореляції між показниками середньої кількості ядерць на клітину та сумарної площі ядерць в ядрі, а також між середньою кількістю ядерць на клітину та часткою площі ядерця від площі ядра. Як показав аналіз, у всіх дослідних групах кількість ядерць статистично достовірно корелює із сумарною площею ядерць у ядрі клітини ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,01$ ). Кореляція між кількістю ядерць та часткою площі ядерця від площі ядра була слабкою ( $r = 0,28$ ,  $p < 0,05$ ).





**Рис. 3.** Числові значення параметрів, що характеризують активність ядерців у лімфоцитах кролів: а) середня кількість ядерців на клітину; б) сумарна площа ядерців в ядрі лімфоцита; в) частка площі ЯО від площі ядра лімфоцита

**Обговорення отриманих результатів дослідження.** Визначення параметрів ядерцевих організаторів у метафазних хромосомах стало поширеним методом дослідження міжхромосомного, міжклітинного, міжіндивідуального, міжвидового та міжпопуляційного поліморфізму. Водночас поширення набувають дослідження похідних структур районів ядерцевих організаторів – ядерець у ядрах інтерфазних лейкоцитів (Wang, Lemos, 2017).

Використання ядерцевих організаторів як тесту, що характеризує фізіологічний і продуктивний стан організму заслуговує на увагу. Останніми роками дослідження параметрів ядерця набули широкого застосування в медицині у прогностичних цілях, для діагностики онкологічних захворювань (Derenzini et al., 2009; Donizy et al., 2017).

У сільськогосподарських тварин рівень активності ділянок хромосом, в яких локалізовані кластери рибосомальних генів і які відповідають за формування ядерця, може слугувати в якості одного із маркерів життєздатності і продуктивності (McStay, 2016). Проведені цитогенетичні дослідження тварин сільськогосподарських видів підтверджують цю особливість. Так, дослідження ролі ядерця в інтерфазних лейкоцитах свині домашньої (*Sus scrofa*) виявили зв'язок між їх параметрами та продуктивними показниками тварин (Skripkin et al., 2021).

Вивчення каріотипу корів молочних порід української селекції показало відмінності в активності ядерцевих організаторів у метафазних хромосомах між чистопородними і кросбредними тваринами. Результати досліджень засвідчили, що кількість активних ядерцевих організаторів у хромосомах досліджених тварин демонструє асоціативну залежність з швидкістю синтезу білка, необхідного для реалізації продуктивності. (Dzitsiuk et al., 2021).

Delany et al. (1994) дослідили поліморфізм показників ядерця у різних популяціях курей. Це свідчить про різну активність рДНК, що в свою чергу впливає на життєздатність, ріст і відтворення курей різного напрямку продуктивності.

Klenovitskiy et al. (2019) у дослідженні каріотипу кіз встановили, що генотип тварин впливає на величину ознак, які характеризують активність рибосомальних генів в інтактних лімфоцитах. Автори доводять, що між числом кластерів генів рРНК і кількістю зафарбованих азотнокислим сріблом центрів в інтактних лімфоцитах існує прямий позитивний кореляційний зв'язок.

У публікації про дослідження параметрів ядерця у інтерфазних клітинах крові вівці автори повідомляють, що гібриди романівських овець з архаром за числом ядерця достовірно переважали чистопородних романівських овець (Klenovitskiy, 2021).

Oznurlu et al. (2011) у результаті цитологічних досліджень шиншил дійшли висновку, що збільшення кількості ядерця в інтерфазних ядрах свідчить про клітинну гіперактивність, швидкість проліферації, та секреторну

активність клітини. Вони вважають, що площа аргірофільних ядерцевих організаторів у є прогностичною ознакою якості хутра.

У кроля домашнього дослідження районів ядерцевих організаторів проводились на препаратах метафазних хромосом, отриманих після 72-годинного культивування клітин крові за стандартною методикою (Monteagudo, Arruga, 1991; Martin-DeLeon, 1978.). Встановлено, що ядерцеві організатори у кроля розміщені на коротких плечах хромосом 13, 16, 20, а також у теломерній області довгих плечей хромосом 21 (Monteagudo, Arruga, 1991). За результатами досліджень, спостерігається індивідуальний поліморфізм ядерцевих організаторів. Дослідження ядерцевих структур у кроликів також проводились на ооцитах (Šutovsky et al., 1993). Дослідники встановили, що конденсація хромосом в ооцитах кролика відбувається одночасно з ущільненням ядра, залежним від синтезу рРНК, і передує руйнуванню ядерної оболонки та відновленню мейозу.

На жаль, дослідження ядерцевих організаторів у сільськогосподарських тварин висвітлюється у науковій літературі обмежено. Зокрема, відсутні дані про дослідження ядерць у інтерфазних клітинах периферійної крові кролів.

Найвні дослідження ядерцевих організаторів у тварин інших видів не дають прямих підтверджень зв'язку між кількістю зафарбованих ядерць інтерфазних лімфоцитатах ядерце організуючими районами у хромосомах. Проведення аналізу морфології ядерць у інтерфазних клітинах крові тварин різних видів, які відрізняються за кількістю кластерів генів рРНК, може допомогти отримати такі докази. Порівняння результатів досліджень на кролях з даними про інші види тварин може дати цінну інформацію про еволюцію та функції ядерцевих організаторів. Тому поглиблені дослідження, спрямовані на вивчення механізмів регуляції експресії генів рРНК та їх зв'язку з ядерцевими організаторами, можуть значно розширити розуміння цих структур.

**Висновки.** Досліджено активність ядерць у інтерфазних лімфоцитах периферійної крові кролів порід полтавське срібло, каліфорнійська та гібридів та встановлено поліморфізм за дослідженими параметрами активності ядерць.

Виявлено статистично значущу різницю між дослідними групами чистопородних і гібридних кролів за показниками середнього число ядерць на клітину, сумарної середня площі ядерць на клітину і частки ядерць від площі ядра лімфоцита.

Кореляційним аналізом встановлено статистично достовірну кореляцію між кількістю ядерць на клітину та сумарною площею ядерць у ядрі клітини ( $r=0,54$ ,  $p<0,01$ ), а також і між кількістю ядерць і часткою площі ядра від площі ядра ( $r=0,28$ ,  $p<0,05$ ).

Результати порівняльного аналізу досліджених параметрів активності ядерних організаторів у лімфоцитах периферійної крові кролів порід

полтавське срібло, каліфорнійської і гібридів свідчать про більш високу активність ядерець у тварин гібридного походження.

Отже, вивчення активності ядерецьких організаторів у клітинах ссавців, зокрема сільськогосподарських видів, набуває особливого значення для прикладних досліджень, оскільки їх параметри характеризують синтез рРНК, відображають проліферативний потенціал клітин та дозволяють оцінити білково-синтетичну функцію клітини. У перспективі результати таких досліджень можуть бути використані для оцінки потенційної здатності тварин до реалізації продуктивних ознак.

### References

1. Ahmad S, Baun J, Tipton B, Tate Y, Switzer R. (2019) Modification of AgNOR staining to reveal the nucleolus in thick sections specified for stereological and pathological assessments of brain tissue. *Heliyon*. 5 (12):3e03047 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03047>.
2. Andraszek K, Horoszewicz E, Smalec E. (2009) Nucleolar organizer regions, satellite associations and nucleoli of goat cells (*Capra hircus*). *Archives Animal Breeding*. 52 (2): 177– 186. <https://doi.org/10.5194/aab-52-177-2009>
3. Bersaglieri C., Santoro R. (2019). Genome organization in and around the nucleolus. *Cells*, 8 (6): 579. [Doi.org/10.3390/cells8060579](https://doi.org/10.3390/cells8060579)
4. Britton-Davidian, J., Cazaux, B., Catalan, J. (2012) Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: micro-evolutionary insights. *Heredity*. 108: 68–74. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.105>
5. Carneiro M, Afonso S, Caraldes A, Garreau H, et al. (2011) The genetic structure of domestic rabbits. *Mol. Biol. Evol.* 28 (6): 1801-1816. DOI: [10.1093/molbev/msr003](https://doi.org/10.1093/molbev/msr003)
6. Chen Z, Comai L, Pikaard C. (1998). Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (25), 14891-14896. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14891>
7. Cockrell A, Gerton J. (2022). Nucleolar Organizer Regions as Transcription-Based Scaffolds of Nucleolar Structure and Function. In: Kloc, M., Kubiak, J.Z. (eds) *Nuclear, Chromosomal, and Genomic Architecture in Biology and Medicine. Results and Problems in Cell Differentiation*, 70. Springer, [https://doi.org/10.1007/978-3-031-06573-6\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-031-06573-6_19)
8. Delany M, Emsley A, Smiley M, Putnam J, Bloom S. (1994) Nucleolar Size Polymorphisms in Commercial Layer Chickens: Determination of Incidence, Inheritance, and Nucleolar Sizes. *Poultry Science*, 73 (8): 1211-1217. <https://doi.org/10.3382/ps.0731211>
9. Derenzini M, Montanaro L, Treré D. (2009). What the nucleolus says to a tumor pathologist. *Histopathology*, 54 (6), 753-762. [doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03168.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03168.x).

10. Donizy P., Biecek P, Halon A., Maciejczyk A., Matkowski R. (2017). Nucleoli cytomorphology in cutaneous melanoma cells—a new prognostic approach to an old concept. *Diagnostic pathology*, 12 (1), 1-9. doi.org/10.1186/s13000-017-0675-7
11. Dzitsiuk V, Typylo H, Mitiohlo I. (2021). Polymorphism of nucleolar organizer regions in different Ukrainian cattle breeds. *Agricultural Science and Practice*, 8 (1), 29-36. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.024>
12. FAO (2015) The second Report on the State of the World’s Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by B.D. Scherf and Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome (available at <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>)
13. Hirai H. (2020) Chromosome Dynamics Regulating Genomic Dispersion and Alteration of Nucleolus Organizer Regions (NORs). *Cells*. 9 (4):971. <https://doi.org/10.3390/cells9040971>
14. Hori Y, Engel C. Kobayashi T. (2023). Regulation of ribosomal RNA gene copy number, transcription and nucleolus organization in eukaryotes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 414–429 <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00573-9>
15. Howell W., Black D. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: in aonestep method. *Experientia*, 36:1014–1015 DOI: [10.1007/BF01953855](https://doi.org/10.1007/BF01953855)
16. King W, Niar A, Chartrain I, Betteridge K, Guay P. (1988) Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *J ReprodFertil*. 82 (1):87-95. doi: 10.1530/jrf.0.0820087
17. Klenovitskiy P et al. (2019). Analysis of the parameters characterizing the nucleolar organizers in intact lymphocytes in crossbreed goats. *Vestnik of Mari state University*. 5 (3): 298-304. Doi:10.30914/2411-9687-2019-5-3-298-304.
18. Klenovitskiy P et al. (2021) Analysis of parameters characterizing argyrophilic zones in intact lymphocytes of domestic sheep (*Ovis aries* L., 1758) and their hybrids with argali (*Ovis ammon* L., 1758). *Agrarian Science*. 344 (1): 52–56. DOI: [10.32634/0869-8155-2021-344-1-52-56](https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-344-1-52-56)
19. Martin-DeLeon PA. (1980) Location of the 18S and 28S rRNACistrons in the genome of the domestic rabbit (*Oryctolagusuniculus* L). *Cytogenet Cell Genet*.28 (1-2):34-40. Doi: 10.1159/000131509.
20. McStay B. (2016) Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev*. 30 (14):1598-610. Doi: 10.1101/gad.283838.116.
21. Monteagudo, L. V., & Arruga, M. V. (1991). NOR activity interaction among the chromosomes of common rabbit: a statistical analysis. *Caryologia*, 44 (1), 85–91. <https://doi.org/10.1080/00087114.1991.10797022>
22. Montiel E, Badenhurst D, Lee L., Valenzuela N. (2022) Evolution and dosage compensation of nucleolar organizing regions (NORs) mediated by mobile elements in turtles with female (ZZ/ZW) but not with male (XX/XY)

heterogamety Journal of Evolutionary Biology. 35 (12): 1709–1720, <https://doi.org/10.1111/jeb.14064>

23. Oktay M, Eroz R, Oktay N A, Erdem H, Basar F, Akyol L, Cucer N, Bahadır A (2015) Argyrophilicnucleolar organizing region associated protein synthesis for cytologic discrimination of follicular thyroid lesions Biotechnic and histochemistry. 90 (3):179–183. DOI: [10.3109/10520295.2014.976271](https://doi.org/10.3109/10520295.2014.976271)

24. Oznurlu Y, Celik I, Sur E, Ozaydin T. (2011) Histological examination of the skin and AgNOR parameters of matrix pili cells in the chinchilla. Eurasian J Vet Sci, 2011, 27, 1, 39-43

25. Oznurlu Y, Çelik I, Sur E, Telatar T, Ozparlak H. (2009) Comparative skin histology of the White New Zealand and Angora rabbits: Histometrical and immunohistochemical evaluations. JAVA, 8, 1694- 1701

26. Pena C, Hurt E, Panse V. (2017) Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. Nat. Struct. Mol. Biol. 24: 689–699. Doi: 10.1038/nsmb.3454

27. Pich A, Chiusa L, Margaria E. (1995) Role of the argyrophilicnucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. Cancer Detect. Prev. 19:282–291

28. Pontvianne F, Blevins T, Chandrasekhara C, Feng W, Stroud H, Jacobsen S. Pikaard C. (2012). Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. Genes and development. 26 (9): 945-957. doi.org/10.1101/gad.182865.111

29. Saadey S, Galal A, Zaky H. El-Dein A. (2008) Diallel crossing analysis for body weight and egg production traits of two native Egyptian and two exotic chicken breeds. International Journal of Poultry Science 7:64–71

30. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. (2000). The AgNOR proteins: Qualitative and quantitative changes during the cell cycle. Micron, 31 (2): 121-126. doi.org/10.1016/S0968-4328 (99) 00068-2

31. Skripkin et al. (2021) Morphological and Functional Activity Dynamics of Blood Lymphocytes in Large White Breed Pigs in Postnatal Ontogenesis and during Pregnancy IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 852 012100. DOI 10.1088/1755-1315/852/1/01210

32. Srikulnath K., Matsubara K., Uno Y. et al. (2009). Karyological Characterization of the Butterfly Lizard (*Leiolepisreevesi*irubritaeniata, Agamidae, Squamata) by Molecular Cytogenetic Approach. Cytogenetic and genome research. 125: 213-23. 10.1159/000230005

33. Šutovsky P, Jelínková L, AntalíkováL, Motlík J. (1993) Ultrastructuralcytochemistry of the nucleus and nucleolus in growing rabbit oocytes, Biology of the Cell, 77:173-180, [https://doi.org/10.1016/S0248-4900 \(05\) 80185-6](https://doi.org/10.1016/S0248-4900 (05) 80185-6).

34. Wang M, Lemos B. (2017) Ribosomal DNA copy number amplification and loss in human cancers are linked to tumor genetic context, nucleolus activity, and proliferation. PLoS genetics, 13 (9), e1006994. doi.org/10.1371/journal.pgen.1006994

UDC 575.113:577.213.3:612.112: 636.92

DOI: <https://doi.org/10.37617/2708-0617.2024.10.69-84>**RESEARCH OF THE ACTIVITY OF rRNA GENES IN NUCLEAR ORGANIZERS OF BLOOD LYMPHOCYTES KINGS OF UKRAINIAN BREEDING**<sup>1</sup>Dzicyuk V.,<sup>2</sup>Bojko O.,<sup>2</sup>Honchar O.,<sup>2</sup>Havrysh O.,<sup>3</sup> Guzyevaty`j O.<sup>1</sup> *Institute of Animal Breeding and Genetics named after M.V. Zubtsia of the National Academy of Sciences of Ukraine*<sup>2</sup> *Cherkassy Experimental Station of Bioresources of the National Academy of Sciences Ukraine,*<sup>3</sup> *Institute of Animal Husbandry of Steppe Regions named after M.F. Ivanova "Askania-Nova" - National Scientific Breeding and Genetic Center for Sheep Breeding National Academy of Sciences Ukraine.*valentynadzitsiuk@gmail.com <https://orcid.org/0000-0001-9697-4165>bioresurs.ck@ukr.net <https://orcid.org/0000-0002-3917-5583><https://orcid.org/0000-0003-2269-9767> <https://orcid.org/0000-0002-8632-6508>

*The study of animal nucleolar organizers makes it possible to assess the level of functional activity of 18S/28S ribosomal genes involved in protein biosynthesis. The aim of the work was to study the signs of nucleoli activity in the interphase blood cells of rabbits of different breeds of Ukrainian breeding.*

*In the experiment, 4-month-old female rabbits of the Poltava Silver breed (n = 30), Californian (n = 25), and their hybrids (n = 21) were used. Zones of nucleoli in intact blood lymphocytes were studied according to the method of Howell and Black (1980). The preparations were stained with a solution of 50% AgNO<sub>3</sub> with the addition of a 1% solution of formic acid and incubated in a humid chamber at a temperature of +60 °C. Microscopy was performed using a microscope "ZEISS, Germany" (magnification 10×100). At least 200 interphase cells were studied in each animal. The activity of nucleoli was evaluated according to the parameters: the average number of nucleoli in the nucleus (nNR), the total area of the nucleus in the nucleus (ΣSNR, μm<sup>2</sup>), and the share of the area of the nucleolus in the area of the lymphocyte nucleus (hΣSNR, %). Statistical analysis was carried out using standard variation statistics programs included in the "STATISTICA" (2020) program package. The average number of nucleolar cells varied from 1.70±0.08 in California rabbits to 5.90±0.29 in hybrid animals. A statistically significant difference (p<0.05) was found between the experimental groups of purebred and hybrid rabbits. The coefficient of variation of the average number of nucleoli per cell was at the average level of variability: 20.58% in rabbits of the Poltava silver*

breed, 19.50% in the California breed, and 16.49% in hybrids. The total area of the nucleus in the cell in all experimental animals varied from 5  $\mu\text{m}^2$  in one of the individuals of the California breed to 12  $\mu\text{m}^2$  in individuals of hybrid origin. The share of the area of the nucleus from the area of the nucleus in Poltava silver, California, and hybrid rabbits was  $26.10 \pm 1.80\%$ ,  $24.30 \pm 1.62$ , and  $29.40 \pm 2.50$ , respectively.

Correlation analysis revealed a statistically significant relationship between the number of nucleoli per cell and the total area of the nucleolus in the cell nucleus ( $r = 0.54$ ,  $p < 0.01$ ) and between the number of nucleoli per cell and the fraction of the area of the nucleolus from the area of the nucleus ( $r = 0.28$ ,  $p < 0.05$ ) in Poltava silver rabbits.

Polymorphism was established according to the studied parameters of nucleoli activity in intact peripheral blood lymphocytes of Poltava silver, California, and hybrid rabbits.

The existence of a statistically significant difference between the research groups of purebred and hybrid rabbits in terms of the number of nuclei per cell, the total area of nuclei per cell, and the fraction of the nucleus from the area of the lymphocyte nucleus has been proven.

The results of a comparative analysis of the studied parameters of the activity of nucleoli in peripheral blood lymphocytes of rabbits of the Poltava silver, California, and hybrid breeds indicate a higher activity of nucleoli in animals of hybrid origin.

**Key words:** nucleus, lymphocyte nucleus, rRNA genes, Ag-banding, rabbits.