

В.И. Сердюкову

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МОРФОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ
ЖИВОТНЫХ им. А.Н. СЕВЕРЦОВА АН СССР

На правах рукописи

УДК 576.316.7:597.553.2

КРЫСАНОВ

ЕВГЕНИЙ ЮРЬЕВИЧ

АНЕУПЛОИДИЯ И ХРОМОСОМНЫЙ МОЗАИЦИЗМ У РЫБ
(на примере представителей семейств *Cyprinodontidae*
и *Synbranchidae*)

Специальность 03.00.10 - Ихтиология

03.00.15 - Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Отпечатано в ИКАНе

Подписано в печать 30.12.87 Т 20264

Формат 60 x 90 1/16. Печ. л. 1.

Заказ 1422. Тираж 100.

Москва 1987

Работа выполнена в Институте эволюционной морфологии и экологии животных им. А. Н. Северцова АН СССР

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

М. И. Шатуновский

доктор биологических наук В. Н. Орлов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук К. А. Савваитова

доктор биологических наук, профессор В. А. Шевченко

Ведущая организация: Всесоюзный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии.

Защита диссертации состоится 9 февраля 1988 г. в 10⁰⁰ часов на заседании специализированного совета Д 00.48.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при Институте эволюционной морфологии и экологии животных им. А. Н. Северцова по адресу: 117071, Москва, Ленинский пр. 33, ИЭМЖ АН СССР.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЭМЖ АН СССР

Автореферат

Ученый
специализированный
кандидат биологических наук

Актуальность проблемы. Несмотря на значительный за последние годы прогресс в цитогенетике рыб, многие вопросы, связанные с изменчивостью хромосомных наборов, остаются малоизученными. Особенно это касается таких проблем, как анеуплоидия и хромосомный мозаицизм. В значительной степени это определяется двумя обстоятельствами: несовершенством методических приемов и высокими диплоидными числами хромосом у рыб.

В то же время, как показали многочисленные работы, выполненные на высших позвоночных и человеке, изучение этих вопросов чрезвычайно актуально для решения многих биологических проблем. Исследование анеуплоидии позволило выявить основные механизмы, лежащие в основе этого явления, например такие, как асинхронное разделение центромеров, ассоциации хромосом, нарушение сегрегации хромосом. Удалось установить определенную взаимосвязь частоты анеуплоидных клеток с совершенством индивидуального гомеостаза, оценить вклад различных факторов в индукцию анеуплоидных клеток, показать, что частота анеуплоидных клеток может меняться на протяжении онтогенеза и как правило связана с нормальным функционированием иммунной и нейроэндокринной систем организма.

В связи с этим большой теоретический интерес представляет изучение анеуплоидии и хромосомного мозаицизма у рыб, как представителей низших позвоночных животных. Исследование этих явлений у рыб позволит выяснить насколько специфичны данные явления у представителей разных классов позвоночных или же суть их одинакова.

Изучение изменчивости хромосомных наборов у рыб имеет важное значение в плане оценки мутагенной активности различных промышленных и бытовых отходов, которые в возрастающем количестве, особенно в последнее десятилетие, загрязняют водоемы. Рыбы, являясь конечным звеном трофической цепи водоемов, аккумулируют различные токсиканты в своем организме. Воздействие токсикантов на генетические структуры может приводить к неблагоприятным последствиям как для особи, так и для популяции в целом. Частота анеуплоидных клеток может служить интегральным показателем совершенства индивидуального гомеостаза, что позволяет использовать ее в качестве одного из индикаторов в цитогенетическом мониторинге.

Цель исследования. Основная цель работы — изучить явление

ВНИРО
№ _____
Библиотека

анеупloidии и хромосомного мозаицизма у рыб на протяжении онтогенеза в норме и при патологических состояниях. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. исследовать динамику спонтанной частоты анеупloidных клеток в онтогенезе у рыб;
2. оценить частоту анеупloidных клеток при патологических состояниях у рыб;
3. изучить индукцию анеупloidных клеток некоторыми органическими соединениями, применяющимися в цитогенетических исследованиях;
4. оценить частоту хромосомного мозаицизма у некоторых видов рыб и выяснить причины, способствующие его возникновению;
5. дать детальную цитогенетическую характеристику видов рыб, перспективных для использования в качестве модельных объектов при разработке методов цитогенетического мониторинга.

Научная новизна работы. Впервые установлена связь между частотой анеупloidных клеток и старением рыб (частота их увеличивается по мере старения организма). Показано, что анеупloidия, в основном, реализуется за счет определенных хромосом набора. Установлено, что возникновение анеупloidных клеток у рыб связано с феноменом асинхронного разделения центромеров, последовательность разделения которых зависит как правило, от количества прицентромерного гетерохроматина (хромосомы, имеющие крупные блоки гетерохроматина разделяются обычно позднее хромосом, имеющих малое количество прицентромерного гетерохроматина). Впервые для рыб показано, что особи, характеризующиеся неустойчивым индивидуальным гомеостазом (личиночные стадии, старые, а также больные рыбы) имеют повышенную частоту анеупloidных клеток. У этих же особей чаще наблюдается и хромосомный мозаицизм, вероятно, отражающий нарушения иммунного гомеостаза.

Показано, что такие вещества как 5-бромдезоксипуридин (5-БДУ) и адриабластин вызывают увеличение как частоты абберантных, так и анеупloidных клеток. Установлено, что механизмы, лежащие в основе индукции анеупloidных клеток для этих двух соединений различны. 5-БДУ вызывает увеличение частоты анеупloidных клеток за счет непосредственного включения в молекулу ДНК (деспирализация прицентромерных районов хромосом и, вероятно, вследствие этого

задержка разделения хромосом). Адриабластин же нарушает иммунный гомеостаз (нарушение репликации ДНК ведет к гибели значительного количества клеток лимфоидного ряда) вследствие этого происходит увеличение частоты анеупloidных клеток.

Практическая новизна. Результаты исследований анеупloidии у рыб являются необходимой теоретической основой разработки критериев для организации цитогенетического мониторинга. Детальная характеристика структуры кариотипов у исследованных видов рыб позволяет рекомендовать их в качестве модельных объектов при постановке цитогенетического мониторинга.

Апробация работы. Материалы диссертации представлялись и докладывались на 11 Всесоюзном совещании по биохимической генетике, кариологическому полиморфизму и мутагенезу у рыб (Ленинград, 1978), на XI У Международном генетическом конгрессе (Москва, 1978), на 11 Всесоюзном совещании по генетике, селекции и гибридизации рыб (Ростов-на-Дону, 1981), на I У Европейском ихтиологическом конгрессе (Гамбург, 1982), на 111 Всесоюзном совещании по генетике, селекции и гибридизации рыб (Тарту, 1986), на 11 Международном семинаре "Методы биоиндикации окружающей среды в районах атомных станций" (Дагомыс, 1987). Публикации. Основные результаты и выводы, содержащиеся в диссертации, изложены в 9 работах.

Объем работы. Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и библиографии. Работа включает 29 рисунков и 12 таблиц. Список литературы содержит 81 отечественных и 196 иностранных работ.

Глава 1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальные исследования проводили на четырех видах рыб: *Nothobranchius rachovii* (Ahl, 1926);

Pterolebias longipinnis (Garman, 1895) - представители сем. *Cyprinodontidae*; *Monopterus albus* (Zuiew, 1793), *Monopterus species* - сем. *Synbranchidae*. Эти виды оказались наиболее пригодными для решения тех задач, которые были сформулированы выше. Указанные виды рыб имеют малое число сравнительно крупных хромосом, которые легко попарно идентифицируются, даже без применения методов дифференциальной окраски. Особенно легко идентифицируют-

ся хромосомы *N.rachovii*, на котором в основном и проведено исследование динамики частоты анеуплоидных клеток на протяжении онтогенеза. Другие виды рыб, которые использованы в данной работе, привлекались для решения некоторых конкретных задач (исследование мозаицизма, спонтанной частоты анеуплоидных клеток, частоты индуцированных и спонтанных aberrаций хромосом). Кроме того, необходимо отметить, что *N.rachovii* характеризуется незначительной продолжительностью жизни (8–10 месяцев), что оказалось очень удобным при изучении динамики частоты анеуплоидных клеток на протяжении онтогенеза.

Помимо этого, все указанные виды обладают высокой пролиферативной активностью клеток тимуса, которые были использованы для приготовления препаратов хромосом. Кариотипы исследованных видов приведены на рисунках (рис. 1–4). Для всех видов рыб провели детальный анализ кариотипов с использованием методов дифференциальной окраски хромосом. Спонтанную частоту анеуплоидных клеток исследовали у всех видов рыб, кроме того у *N.rachovii* проведено сопоставление частот анеуплоидных клеток в разных возрастных группах (личинки сразу после выклева, "молодые" (возраст 2–3 месяца) и старые особи (возраст 8–9 месяцев)). У *N.rachovii* исследовали также уровень анеуплоидных клеток у больных оодинезом рыб. У *P.longipinnis* исследовали частоту анеуплоидных клеток у двух групп: личинок сразу после выклева и у "молодых" особей. Спонтанный уровень анеуплоидных клеток у *M.albus* и *M.sp.* определяли только у "молодых" рыб. Исследовали также воздействие двух органических соединений (5-бромдезоксисуридина и адриабластина) на индукцию анеуплоидных клеток и хромосомных aberrаций у *N.rachovii* и *P.longipinnis*.

Их влияние исследовано на тех же возрастных группах, на которых определен спонтанный уровень данных показателей. Для исследования хромосомного мозаицизма в основном использовали два вида рыб *N.rachovii* и *P.longipinnis*. При постановке экспериментов по индукции хромосомных aberrаций и анеуплоидных клеток в каждом опыте использовали по 5–7 экземпляров рыб. Число проанализированных метафаз от одной особи составляло не менее 25. При отборе метафазных пластинок для анализа руководствовались общепринятыми критериями (Орлов, 1978). При подсчете числа хромосом анализировали лишь те мета-

фазы, которые имели число хромосом не менее 2n–4. Метафазы с меньшим числом хромосом не учитывали. Количество исследованного материала представлено в таблице 1, где также указано для анализа какого явления использованы те или иные виды рыб.

Препараты хромосом получали из клеточной суспензии тимуса рыб по методу (Kligerman, Bloom, 1977). Окрашивали препараты 2% раствором Гимза на фосфатном буфере. Дифференциальное окрашивание хромосом проводили согласно Romain (1982) для выявления гетерохроматина; согласно Khalid (1979), для получения картины поперечной исчерченности хромосом; согласно Howell and Black (1980) при окрашивании районов ядрышкового организатора и согласно Takayama & Matsumoto (1982) для получения картины дифференциальной репликации хромосом.

Таблица 1.

Вид	Возрастные группы рыб			Что изучалось
	личинки	молодые	старые	
<i>N.rachovii</i>	20+	79	16	анеуплоидия мозаицизм aberrации хромосом
	257	4945	2257	
<i>P.longipinnis</i>	14	53	-	---"
	428	3141	-	
<i>M.albus</i>	-	15	-	анеуплоидия
	-	1138	-	
<i>M.species</i>	-	5	-	---"
	-	347	-	

+ В числителе указано число экземпляров, в знаменателе число проанализированных метафаз



XX

Рис. 1

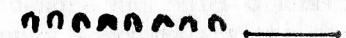


Рис. 2

ХХХХХ

АААААААААА

ВВВВВВВВВВ

СССССССССС

Рис.3

На рисунках представлены кариотипы *N.rachovii* $2n=16$ (рис.1); *P.longipinnis* $2n=20$ (рис.2); *M.albus* $2n=24$ (рис.4); *M.species* $2n=18$ (рис.3).

Рис.4

Глава 2. АНЕУПОИДИЯ В КЛЕТКАХ ТИМУСА РЫБ.
Сравнение спонтанных частот анеуплоидных клеток у четырех видов рыб показало, что они колеблются в пределах 5,2 - 10,3% для разных видов. Так для *N.rachovii* спонтанная частота анеуплоидных клеток составляет 10,3%; для *P.longipinnis* 7,6%; для *M.albus* 8,7%; для *M.sp.* 5,2%. К сожалению, за исключением работ, выполненных на эмбрионах (стадия бластулы) практически отсутствуют данные об уровне спонтанной анеуплоидии у рыб. В данном контексте, однако, результаты, полученные на эмбриональном материале, не анализируются. Пожалуй, только по одной работе, выполненной на культуре лейкоцитов радужной форели (Hartley & Horne, 1984), возможно оценить спонтанную частоту анеуплоидных клеток. В данном случае она составляет 7,5%. К сожалению, не представляется возможным определить за счет каких хромосом набора реализуется анеуплоидия, поскольку попарная их идентификация не проводилась. Приведенные выше данные показывают средние частоты анеуплоидных клеток в тимусе у исследованных видов сходных возрастных групп. Однако частоты среди отдельных индивидумов варьируют в достаточно широких пределах. У некоторых экземпляров вообще не отмечено анеуплоидных клеток, тогда как у других частота анеуплоидных клеток может достигать 41,8%. Необходимо отметить, что экземпляры, не имеющие анеуплоидных клеток, зарегистрированы в основном в группах молодых животных и личинок, не подвергавшихся какому-либо воздействию. Особи же, имеющие высокую частоту анеуплоидных клеток, как правило, встречаются среди старых или больных животных. Кроме того, при воздействии 5-БДУ или адриабластином практически все животные характеризуются наличием анеуплоидных клеток. Следует, однако иметь в виду, что зачастую анеуплоид-

ные клетки могут быть результатом методических погрешностей (Danford, 1984). В данной работе мы оценили вклад различных методических приемов в индукцию анеуплоидных клеток. Оказалось, что при соблюдении оптимальных условий приготовления хромосомных препаратов (непродолжительная инкубация в колхицине и гипотоническом растворе) частота анеуплоидных клеток практически не изменяется. Частота анеуплоидных клеток увеличивается в основном за счет продолжительной инкубации в гипотоническом растворе, тогда как инкубация в колхицине в меньшей мере влияет на частоту анеуплоидных клеток. Поэтому в своих исследованиях мы применяли минимально-возможное воздействие этими веществами. Методика приготовления препаратов хромосом во всех экспериментах была стандартной.

Исследование частоты анеуплоидных клеток у разных возрастных групп показало, что наибольшие спонтанные частоты характерны для личинок и старых рыб (табл.2). Кроме того, значительное количество анеуплоидных клеток наблюдается у больных оодинезом рыб (табл.2). Таблица 2
Спонтанные частоты анеуплоидных клеток в разных возрастных группах здоровых и больных оодинезом рыб.

Вид	Здоровые рыбы		Больные рыбы (молодые)	
	личинки	молодые старые	молодые	старые
<i>N.rachovii</i>	13,3/-	9,8/0,5	14,2/0,3	15,5/1,3
<i>P.longipinnis</i>	10,5/-	4,7/0,3	не исследовались	

+ В числителе указана частота гиподиплоидных клеток, в знаменателе гипердиплоидных.

Инкубация животных с 5-БДУ или адриабластином приводила к увеличению частоты анеуплоидных клеток. Для *N.rachovii* частота анеуплоидных клеток увеличивалась в среднем на 2-5%, тогда как для *P.longipinnis* она увеличивалась на 10-25%, в зависимости от применяемого соединения (адриабластин приводил к большему увеличению частоты анеуплоидных клеток). Спустя некоторое время после воздействия (10-20 суток) частота анеуплоидных клеток снижалась, оставаясь, однако, несколько выше спонтанного уровня. У старых рыб снижение частоты анеуплоидных клеток было менее выражено, чем у молодых животных.

При анализе частоты клеток, утративших одну или более хромосом, оказалось, что наиболее часто происходит утрата одной хромосомы. Около 60% анеуплоидных клеток у *N. rachovii* характеризовались отсутствием одной хромосомы. Сходная картина наблюдалась и для *P. longipinnis*. По всей вероятности, клетки, утратившие более чем одну хромосому, быстро элиминируются из клеточной популяции.

В своей работе мы также оценили частоту утрат отдельных хромосом набора у *N. rachovii*. Оказалось, что эти частоты не равны (табл. 3). Наиболее часто терялись хромосомы 8, 4 и 7.

Таблица 3

Частоты утрат отдельных хромосом набора у *N. rachovii*

Число метафаз	Утраченные хромосомы							
	1	2	3	4	5	6	7	8
6998	21+	22	47	188	74	77	170	221
	0,3	0,3	0,7	2,7	1,1	1,1	2,4	3,2

+ В числителе приведены абсолютные значения, в знаменателе относительные

Затем согласно методике (Vig, 1981), определили последовательность разделения центромеров, которая оказалась следующей: 8, 5, (1, 2, 3), 6, 7, 4 (первыми приведены наиболее рано разделяющиеся хромосомы). Последовательность разделения хромосом оказалась связанной с количеством прицентромерного гетерохроматина (чем меньше его блоки, тем раньше разделяются хромосомы). Из приведенных данных легко заметить, что анеуплоидия, как правило, реализуется за счет либо наиболее рано разделяющихся хромосом (8), либо за счет наиболее поздно разделяющихся (4, 7). Сходные данные получены при анализе анеуплоидии у человека (Vig, 1981; Abruzzo, 1985).

Необходимо отметить, что связь анеуплоидии с определенными хромосомами набора оставалась сходной во всех возрастных группах у данного вида. Изменялись же только частоты утрат одних и тех же хромосом в разных возрастных группах как у контрольных, так и у подвергшихся воздействию животных. Наибольшие частоты были у старых, больных (как в контроле, так и при воздействии 5-БДУ), наименьшие были у животных, подвергшихся действию адриабластина (по сравнению с контрольными), что

вероятно, связано с сильным мутагенным действием адриабластина, приводящего к гибели значительного количества клеток. Из таблицы 2 также следует, что частота анеуплоидных клеток связана главным образом с гиподиплоидией, тогда как гипердиплоидные клетки встречаются с частотой в 10-15 раз меньшей. Следует также отметить, что гипердиплоидия, также как и гиподиплоидия в основном обусловлена одними и теми же хромосомами (8, 7, 4). Низкая частота гипердиплоидных клеток может объясняться различными причинами (реверсией их к диплоидным, более низкой пролиферацией, более быстрой, по сравнению с гиподиплоидными, элиминацией из клеточной популяции).

Таким образом, из приведенных данных очевидно, что анеуплоидные клетки не являются методическим артефактом. Основной причиной образования анеуплоидных клеток является феномен асинхронного разделения центромеров. В дальнейшем, на основе этого явления, увеличение частоты анеуплоидных клеток может быть связано с разнообразными как эндо-, так и экзогенными влияниями. Показано, например (Ильинских и др., 1986), что неиммунные лимфоциты способны снижать число клеток с численными нарушениями хромосом (моно- или трисомиями по определенным хромосомам набора). Не исключено, что клетки с анеуплоидным набором хромосом имеют антигенно измененную поверхность, что при восприятии их иммунными клетками может приводить к гибели первых. Поскольку иммунная система (в частности ее центральное звено тимус) функционирует на разных стадиях онтогенеза с различной интенсивностью, что подтверждено исследованиями (Cooper et al., 1983) на близком виде нотобранхиуса - *N. guentheri*, то, весьма вероятно, что частота анеуплоидных клеток зависит от иммунного гомеостаза организма. Нарушение его приводит к увеличению доли анеуплоидных клеток, что очевидно из приведенных данных (повышенная частота анеуплоидных клеток у личинок, старых и больных рыб). В свою очередь иммунный гомеостаз тесно связан с функционированием нейроэндокринной системы (Бородин и др., 1987), причем связь эта двусторонняя. Воздействие внешних факторов может приводить к нарушению этих взаимосвязей, т.е. к нарушению индивидуального гомеостаза. Каковы бы не были причины, приводящие к нарушению индивидуального гомеостаза, одним из показателей этого является частота анеуплоидных клеток. В общем виде это, вероятно, можно сформулировать следующим образом: чем

более совершенен индивидуальный гомеостаз, тем меньше частота анеуплоидных клеток. Это дает возможность использовать частоту анеуплоидных клеток в качестве интегрального показателя совершенства индивидуального гомеостаза и тем самым применять ее в качестве одного из индикаторов при цитогенетическом мониторинге.

Глава 3. ХРОМОСОМНЫЙ МОЗАИЦИЗМ У РЫБ

Наиболее обширные данные о хромосомном мозаицизме в настоящее время получены либо при цитогенетических исследованиях клеточных культур, либо при анализе хромосомных наборов человека и некоторых млекопитающих. Под хромосомным мозаицизмом мы понимаем одновременное существование в клеточной популяции одного или нескольких клеточных клонов, отличающихся друг от друга по структуре или числу хромосом. У рыб также зачастую описывали особей с мозаичным кариотипом. Следует, однако заметить, что диагностика мозаицизма достаточно сложна даже у видов с четко идентифицируемыми хромосомами набора. Поскольку до настоящего времени затруднена попарная идентификация хромосом у рыб, к имеющимся в литературе сведениям о наличии мозаицизма у них необходимо относиться с осторожностью. Из литературных данных в настоящее время известен мозаицизм типа 1п/2п, 2п/3п у эмбрионов нерки (Черненко, 1976) и по добавочным хромосомам у чира (Фролов, 1986).

Исследования, проведенные на двух видах карпозубых рыб, показали, что у некоторых особей имеются клетки несущие однотипные либо структурные, либо численные изменения хромосом с достаточно высокой частотой. Поскольку, как отмечалось выше, работы по хромосомному мозаицизму у рыб практически отсутствуют, то оценить частоту клонов характерную в целом для рыб не представляется возможным. Известно, однако, что мозаицизм не является редким типом аномалий. Частота мозаичных клонов варьирует в достаточно широких пределах от 5 до 95% (Кулешов, Алексин; 1974) в практике мозаиками считаются особи, имеющие сходные хромосомные аномалии не менее, чем в 10% клеток (Кулешов, Симонян; 1987). Необходимо, однако, отметить, что частота клона зависит от разнообразных обстоятельств, важнейшим среди которых, вероятно, является состояние иммунной системы (Ильинских и др., 1986), которая у рыб менее совер-

шенна, чем у других позвоночных животных (Купер, 1980).

В данной работе мозаичными считали тех особей, у которых частота клеток с идентичным изменением хромосом превышала таковую, найденную для всей выборки в целом. В ряде случаев, частота мозаичного клона была выше 10%, т.е. выше той, которая принята при анализе мозаицизма у человека. При анализе полученных данных были обнаружены мозаичные клоны у *N. rachovii*: моносомии по хромосомам 4, 7, 8 с частотой от 8 до 16%. Кроме того у этого же вида были обнаружены клоны со структурным изменением хромосом (транслокация части длинного плеча хромосомы 5 на хромосому 8) – 5 экземпляров с частотой от 1,5 до 2,7% (рис. 5). У *P. longipinnis* было обнаружено две особи, имеющие структурную перестройку типа центрического слияния, частота клеток с таким изменением составляла 5,4%, к тому же у одной из этих особей встречались с частотой 3,4% клетки, имеющие кариотип $2п=18$ и соответственно две метацентрические хромосомы (рис. 6 и 7). Кроме того, у данного же вида была обнаружена особь со структурной перестройкой типа перичентрической инверсии, частота таких клеток составляла 6,0% (рис. 8)



Рис. 5

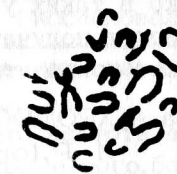


Рис. 6

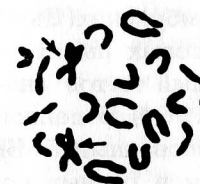


Рис. 7



Рис. 8

На рисунках представлены метафазы с транслокацией у *N. rachovii* (рис. 5); с центрическим слиянием у *P. longipinnis* (рис. 6 и 7) и с перичентри-

ческой инверсией у *P. longipinnis* (рис. 8).

Необходимо также отметить, что клеточные клоны, как правило, наблюдаются у особей, имеющих высокую частоту анеуплоидных клеток от 16 до 24%. Кроме того, это либо старые или больные экземпляры, либо подвергавшиеся какому-то воздействию (5-БДУ, адриабластин), т.е. особи, имеющие нарушения в функционировании иммунной системы.

Интересно также, что численный хромосомный мозаицизм реализуется за счет тех же хромосом, что и анеуплоидия (хромосомы 8, 7, 4 у *N. rachovii*). Весьма вероятно, что анеуплоидия в условиях ослабления иммунного гомеостаза может приводить к достаточно успешной пролиферации клеточного клона, характеризующегося моносомией по определенным хромосомам набора (в данном случае хромосомам 8, 7, 4). Имеющиеся у нас данные, полученные при включении 5-БДУ, показывают, что моносомные клетки, вероятно, могут проходить по крайней мере три последовательных деления.

Таким образом, результаты исследования хромосомного мозаицизма показали, что: во-первых, данное явление не является редкой аномалией, а, во-вторых, что оно тесно связано с нарушением индивидуального гомеостаза, поскольку, вероятно, только в таких условиях клетки с хромосомными аномалиями могут получать некоторое селективное преимущество, что может приводить к образованию клона.

Глава 4. ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ У *N. rachovii* И *P. longipinnis*.

Рыбы достаточно часто используются в качестве тест-объектов при оценке мутагенного воздействия разнообразных факторов внешней среды. Как правило, применяется анафазный метод анализа aberrаций хромосом, как на эмбрионах (Цыцугина, 1973; Kocan, 1982), так и на взрослых рыбах (Строева, 1987). Реже применяется метафазный метод анализа К-митозов (Alink, 1982; Kligerman, 1984). В данной работе мы исследовали спонтанный и индуцированный (5-БДУ и адриабластин) уровни aberrаций хромосом в разных возрастных группах у рыб. Изучали также распределение разрывов по отдельным хромосомам набора у *N. rachovii*. Основными типами aberrаций были хромосомные и хроматидные разрывы, обменные хромосомные перестройки встречаются реже. Следует также отметить, что при использовании

5-БДУ (концентрация 100 мг/л), как правило, aberrантные клетки несли только одну перестройку хромосом, тогда как при использовании адриабластина (концентрация 10 мг/л) клетки часто содержали несколько aberrаций хромосом. При подсчете частот aberrаций хромосом мы не разделяли их на истинные хромосомные и хроматидные разрывы и ахроматические пробелы (гэпы), поскольку их дифференциация зачастую достаточно трудна и нередко носит весьма субъективный характер. К тому же, согласно (Brogger, 1982) включение гэпов в общую частоту aberrаций хромосом не приводит к искажению результатов при сопоставлении частот перестроек хромосом в контрольной и опытной группах.

При сопоставлении спонтанных частот aberrантных клеток в разных возрастных группах у двух видов карпозубых видно, что они различаются в этих группах (табл. 3)

Таблица 3

Спонтанные частоты aberrантных клеток в разных возрастных группах здоровых и больных оодинезом рыб

Вид	Возрастные группы			Больные рыбы
	личинки	молодые	старые	
<i>N. rachovii</i>	-	33/2,8	34/8,8+	46/6,7
<i>P. longipinnis</i>	5/1,2	15/4,7	не	исследовались

+ В числителе приведены абсолютные, а в знаменателе относительные значения.

Из приведенной таблицы очевидно, что частота aberrантных клеток увеличивается с возрастом, кроме того, больные животные также имеют повышенную частоту таких клеток.

При исследовании индуцированных 5-БДУ и адриабластином aberrаций хромосом оказалось, что частота их увеличивается, причем в случае с адриабластином более значительно. Так, при инкубации в 5-БДУ частота aberrантных клеток у *N. rachovii* составляла у личинок 4,9 у молодых 7,5 и у старых 12,9%. У *P. longipinnis* в группе молодых животных частота aberrантных клеток после экспозиции в 5-БДУ составляла в среднем 14,4%. При инкубации же в растворе адриабластина частоты aberrантных клеток были следующими: у молодых особей *N. rachovii* - 27,2%, у молодых *P. longipinnis* - 37,9%. Большая частота aberrаций хромосом при воздействии адриабластином, объясняется тем, что он нарушает репликацию ДНК. Интерес-

но рассмотреть также данные, по частоте абберантных клеток спустя 18 суток после воздействия вышеназванными соединениями. Оказалось, что у *N. rachovii* частота абберантных клеток после воздействия 5-БДУ составила 7,4%; у *P. longipinnis* 8,0%, что примерно в два раза выше спонтанной, тогда как после воздействия адриабластином частоты соответственно равны 7,3 и 3,9%. По всей вероятности, меньшее падение частоты абберантных клеток при воздействии 5-БДУ связано с более медленным его выведением из организма.

Исследуя распределение разрывов по отдельным хромосомам у *N. rachovii*, показали, что наибольшая их частота свойственна хромосомам 3 и 5 (как спонтанная, так и индуцированная). Причем разрывы наблюдались, как правило, либо в гетерохроматиновых районах (особенно вблизи центромеры), либо на границе гетеро- и эухроматиновых районов. Подобная закономерность в распределении разрывов показана многими исследователями. Сопоставляя частоты анеуплоидных клеток с частотами абберантных, видим, что спонтанные их значения более низки для последних, что по всей вероятности, связано со значительными нарушениями хромосомного баланса, как правило, приводящим к гибели клеток.

Воздействие мутагенов приводит к большему увеличению частоты абберантных клеток, нежели анеуплоидных. После прекращения мутагенного воздействия снижение частоты абберантных клеток происходит достаточно интенсивно, тогда как частота анеуплоидных клеток снижается довольно медленно. По всей вероятности, это связано с тем, что анеуплоидные клетки обладают большим пролиферативным потенциалом. Имеющиеся в литературе данные показывают, что даже одна абберация является как правило, летальным событием, тогда как анеуплоидия не всегда ведет к гибели клетки.

В заключении следует отметить, что увеличение частот анеуплоидных и абберантных клеток по мере старения организма, по всей вероятности, обусловлено разными причинами. Если увеличение частоты анеуплоидных клеток в большей степени связано с изменениями в иммунной системе, то увеличение частоты абберантных клеток в большей степени вызвано нарушениями в репарации ДНК (Михельсон, 1983).

ВЫВОДЫ

1. Существование анеуплоидных клеток невозможно объяснить только методическими причинами. Подобные клетки нормально встречаются в организме на протяжении всего онтогенеза. Частота анеуплоидных клеток, однако, различна на отдельных его этапах.
2. Частота анеуплоидных клеток выше у личинок, старых и больных рыб, по сравнению с молодыми животными. Эти различия, на наш взгляд, связаны с функциональными особенностями иммунной системы на разных этапах онтогенеза.
3. Причиной, лежащей в основе возникновения анеуплоидных клеток, является феномен асинхронного разделения центромер, что подтверждается наблюдениями, выполненными на *M. rachovii*. Факты приведенные в настоящей работе однозначно показывают, что анеуплоидия реализуется либо за счет поздно разделяющихся хромосом, либо, наоборот, за счет рано разделяющихся.
4. Показано, что мозаицизм не является редким событием. Анализ хромосомных наборов двух видов карповозубых рыб, проведенный в данной работе, показал наличие мозаичных клонов, отличающихся от нормальных клеток либо по числу, либо по структуре хромосом.
5. Хромосомный мозаицизм и анеуплоидия - два взаимосвязанных явления; первое, являясь предельным выражением второго, зависит от состояния иммунной системы.
6. Хромосомные абберации вносят незначительный вклад в изменение частоты анеуплоидных клеток. Данные явления, по всей вероятности, объясняются разными причинами; если частота анеуплоидных клеток, главным образом, зависит от состояния иммунной системы организма, то частота абберантных клеток, вероятно, в большей степени зависит от совершенства репаративной системы клетки.
7. Детальный анализ кариотипов, использованных в данной работе видов рыб, дает возможность заключить, что указанные виды являются чрезвычайно удобными при проведении токсикологических экспериментов, при организации цитогенетического мониторинга, а также при изучении изменчивости хромосомных наборов при старении организма.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Крысанов Е.Ю. Хромосомный полиморфизм беломорской сельди Онежского залива. - Тезисы докл. 11 Всесоюзного совещания по биохимической генетике, кариологическому полиморфизму и мутагенезу у рыб. Л., 1978, с. 8.
2. Крысанов Е.Ю. Исследование хромосомных наборов рыб на ранних стадиях онтогенеза методом дифференциального окрашивания. - Тезисы докл. XIV Международного генетического конгресса. М., 1978, с. 262.
3. Крысанов Е.Ю. Об изменчивости числа хромосом у сельдей. - В кн. Экология рыб Белого моря (под ред. Ю.Е. Лапина) М., "Наука", 1978, с. 94-98
4. Крысанов Е.Ю., Еловенко В.Н. Структурные особенности кариотипов головешки *Percottus glehni* Dybowski (*Eleotridae*) в разных частях ареала. - Вопр. ихтиологии, 1981, т. 21, №5, 950-952
5. Krysanov E. Yu. Caryotypic heterogeneity of blood cells in fishes. Abstr. IV Congress of European Ichthyologists, Gamburg, 1982, p. 165.
6. Крысанов Е.Ю. Хромосомные комплексы некоторых рыб Копорской губы Финского залива. - В кн. Экологические аспекты исследований водоемов-охладителей АЭС. М., 1983, с. 118-126.
7. Крысанов Е.Ю. Влияние теплового загрязнения на структурные изменения кариотипов рыб. - Тезисы докл. 11 Всесоюзного совещания по генетике, селекции и гибридизации рыб. Ростов-на-Дону, 1981, с. 163-164.
8. Krysanov E. Etude des caryotypes chez les *Nothobranchius*. Killi Revue, 1985, n6, 31-32.
9. Крысанов Е.Ю., Борисов В.И. Цитогенетический и биохимический анализ некоторых видов рода *Nothobranchius*, *Cyprinodontidae*. Тезисы докл. 111 Всесоюзной конференции по генетике, селекции и гибридизации рыб. Тарту, 1986, с. 117-118.