

УДК 575.24

ИНДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ ЭТОПОЗИДОМ У *CYCLOPS KOLENSIS* И *CYCLOPS INSIGNIS* (COPEPODA, CRUSTACEA)

А.К.Гришанин^{1,2}, Г.Э.Гришанина²

¹Институт биологии внутренних вод Российской Академии Наук, 152742, Борок Ярославской обл., Россия

²Университет природы, общества и человека «Дубна», 141980, г. Дубна Московской обл., Россия.

Изучена частота хромосомных aberrаций в эмбриональных клетках *Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis*, индуцированных этопозидом. Показано снижение частоты хромосомных aberrаций в последиминуционных клетках соматической линии *Cyclops kolensis*. Отмечено отсутствие изменений в выходе хромосомных aberrаций в эмбриональных клетках *Cyclops insignis* на соответствующих стадиях эмбриогенеза. Не обнаружено достоверных отличий в выходе хромосомных aberrаций в клетках соматической линии эмбрионов *Cyclops kolensis*, которые экспонировались в растворах этопозиды повышающихся концентраций.

Ключевые слова: *Cyclops*, этопозид, диминуция хроматина, хромосомные aberrации.

THE INDUCTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS BY ETOPOSIDE IN *CYCLOPS KOLENSIS* И *CYCLOPS INSIGNIS* (COPEPODA, CRUSTACEA)

A.K. Grishanin^{1,2}, G.E. Grishanin²

¹Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences 152742, Borok Yaroslavl Prov., Russia

²Dubna International University for Nature, Society and Man, 141980, Dubna, Moscow Prov., Russia

The frequency of chromosome aberrations in the embryonic cells of *Cyclops kolensis* and *Cyclops insignis* was determined when cyclops embryos were treated with Etoposide. A reduction in the frequency of chromosome aberrations (CA) in somatic cells lines *Cyclops kolensis* after chromatin diminution was installed. It's shown that chromosome aberrations frequency of *Cyclops insignis* at appropriate stages of embryogenesis due to the impact of Etoposide solution of the same concentration did not change. The significant differences in the CA frequencies of somatic line cells of *Cyclops kolensis* when embryos were exposed in increasing concentrations of Etoposide solutions out.

Key words: *Cyclops*, Etoposide, chromatin diminution, chromosomal aberrations.

Введение

Наследственная изменчивость зависит как от характеристик физических и биологических факторов, воздействующих на генетический материал, так и от свойств тех или иных участков генома, на которые эти факторы воздействуют. Наиболее существенные для организма последствия мутационного процесса наблюдаются в том случае, когда нарушение затрагивает кодирующие участки генома, составляющие у эукариот незначительную часть ядерной ДНК, располагаясь в основном в эухроматических участках хромосом (Schofer and Weipoltshammer 2008). У подавляющего числа эукариот соотношение эухроматиновых и

гетерохроматиновых районов хромосом остается неизменным на протяжении всего онтогенеза, но у немногих эукариотических организмов вследствие процесса диминуции хроматина (ДХ) изменяется структура генома в результате удаления из хромосом клеток соматической линии значительной части гетерохроматина в виде отдельных хромосом или их фрагментов (Гришанин и соавт., 2006). Диминуция хроматина (ДХ) обнаружена у некоторых пресноводных ракообразных и характеризуется вырезанием из преддиминуционных хромосом гетерохроматиновых сегментов и сшиванием эухроматических остатков с восстановлением целостности хромосом и их диплоидного числа (Гришанин и соавт., 1996). Химический хромосомный мутагенез у видов, в онтогенезе которых происходит ДХ, до сих пор не был исследован. В качестве мутагена мы выбрали этопозид. Этопозид — производное эпидофиллотоксина, обладает противоопухолевой активностью, индуцируя апоптоз в злокачественных клетках (Fournel et al., 1995). Механизм действия этопозидов состоит в стабилизации разрезов двунитевой ДНК внутри ковалентных комплексов топоизомеразы II (topo II) с ДНК, предотвращая соединение разорвавшихся концов ДНК (Wang, 1985). Исследования на лимфоцитах человека показали, что этопозид формирует также однонитевые разрывы ДНК, что приводит к нарушению процессов репликации, транскрипции и репарации (Тронов и соавт., 1999).

Учитывая особенности действия этопозидов на живые объекты, мы предположили, что при его воздействии на эмбрионы *Cyclops kolensis* Lilljeborg 1901 во время додиминуционных делений дробления может наблюдаться эффект ингибирования ферментов, восстанавливающих целостность хромосом после вырезания из них фрагментов элиминируемой ДНК и, как следствие, появление в клетке отдельных фрагментов хромосом, число которых значительно превысит диплоидное число хромосом. Нас также интересовали частоты индуцируемых этопозидом АХ в клетках зародышей *Cyclops kolensis* до и после ДХ, и *Cyclops insignis* Claus, 1857, у которого диминуция хроматина не обнаружена (Grishanin et al. 2004) Для проверки этого предположения в настоящем исследовании была поставлена задача — сравнить мутагенное действие этопозидов на вид циклопа, обладающего ДХ в онтогенезе - *Cyclops kolensis*, и на вид циклопа, у которого диминуция хроматина не обнаружена - *Cyclops insignis*.

Материал и методы исследования

Для исследования действия этопозидов на клетки циклопов были использованы зародыши *Cyclops kolensis* Lilljeborg, 1901 и *Cyclops insignis* Claus, 1857, выловленные в апреле 2012-2013 г.г. в Марьинском пруду на Воробьевых горах в г. Москва. Стадии дробления зародышей вышеуказанных циклопов определяли *in vivo* при помощи светового микроскопа по разработанной ранее методике (Гришанин и соавт. 1996). Зародышей помещали в растворы этопозидов заданной концентрации, приготовленные на основе отфильтрованной прудовой воды. Выход aberrаций хромосом (АХ) определяли ана-телофазным методом, фиксируя мосты и фрагменты хромосом. Метафазный метод для изучения хромосомного мутагенеза у зародышей циклопов сильно затруднен вследствие плохой проницаемости колхицина и колцемида через стенки яичевого мешка и яиц. Анализ анафаз и ранних телофаз проводили на стадиях 2-3 и 5-7 делений дробления. Выбор зародышей *C. kolensis* вышеуказанного возраста обусловлен прохождением диминуции хроматина у этого вида во время 4-го деления дробления. Хотя у российской популяции *C. insignis* ДХ не наблюдается (Grishanin et al. 2004), но для корректности сравнительной оценки частоты хромосомных aberrаций у видов *Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis*, зародыши *C. insignis* отбирали также на стадиях 2-3 и 5-7 делений дробления. Мы были вынуждены ограничить число экспериментов с *C. insignis* вследствие недостаточного числа выловленных индивидуумов этого вида, обусловленного низкой

плотностью популяции *C. insignis* в Марьинском пруду. Репродуктивный период у обоих видов циклопов в Марьинском пруду приходится на апрель месяц. Интервал времени между экспозицией в растворе этопозида и фиксацией зародышей в смеси этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 обусловлен длительностью клеточного цикла у циклопов (Гришанин и соавт. 1996) и был равен или превышал интервалы между делениями дробления. Определение достоверности разности между полученными значениями АХ при разных концентрациях действующего агента этопозида проводили по критерию Фишера (Плохинский, 1970).

Результаты исследования и их обсуждение

Тщательные исследования клеток последиминуционных зародышей *C. kolensis* не обнаружили наличие в них фрагментов хромосом. Следовательно, наше предположение о задержке этопозидом процессов сшивки участков доминантных хромосом *C. kolensis* после вырезания из них элиминируемых фрагментов не подтвердилось результатами проведенного эксперимента.

Цитогенетические исследования показали отсутствие достоверных отличий между частотами АХ, индуцированных этопозидом в клетках зародышей *C. kolensis* во время последиминуционных делений дробления (Табл. 1).

Таблица 1.

Экспозиция эмбрионов *Cyclops kolensis* во время 5-7 деления дробления (после ДХ).

Т (мин)	N	n	АХ/кл±SE
5 мг/л			
90	6	93	0,11±0,03
контроль	7	104	0
120	9	180	0,08±0,02
контроль	9	194	0
10 мг/л			
60	6	140	0,06±0,02
контроль	7	160	0
90	7	129	0,11±0,03
контроль	8	144	0
120	10	199	0,08±0,02
контроль	9	170	0
180	7	176	0,08±0,02
контроль	6	154	0
20 мг/л			
60	7	127	0,12±0,03
контроль	6	116	0
90	7	152	0,09±0,02
контроль	5	80	0
120	6	122	0,11±0,03
контроль	6	109	0
180	8	181	0,13±0,03
контроль	5	89	0
50 мг/л			
60	6	113	0,10±0,03
контроль	5	126	0
90	7	136	0,08±0,02

контроль	7	104	0
120	8	93	0,11±0,03
контроль	8	118	0
180	7	149	0,05±0,02
контроль	6	125	0
100 мг/л			
90	7	106	0,06±0,02
контроль	9	130	0
120	9	164	0,02±0,01
контроль	6	91	0
180	9	149	0,08±0,02
контроль	7	101	0

T – время экспозиции в растворе этопозиды, N – число самок с яйцевыми мешками; n – число исследованных анафаз и телофаз, АХ/кл – число аберраций хромосом (мосты и фрагменты) на одну клетку, SE – стандартная ошибка.

Неизменный уровень выхода АХ в клетках последиминуционных зародышей *C. kolensis* при увеличении концентрации этопозиды показывает отсутствие прямой зависимости между концентрацией этопозиды в воде и частотой АХ. Можно предположить, что мутагенная активность этопозиды не связана с прямым воздействием этого вещества на молекулу ДНК, а опосредована созданием определенного уровня негативных изменений внутриклеточной среды индуцирующих АХ у эмбрионов *C. kolensis*. При этом увеличение концентрации этопозиды не изменяет результирующий эффект этих изменений.

Основным результатом данной работы мы считаем обнаружение достоверных различий ($\beta > 0,999$) между частотами АХ у зародышей *C. kolensis* до и после ДХ при экспозиции их в растворе этопозиды в концентрации 100 мкг/л (Табл.1, 2).

Таблица 2.
Экспозиция эмбрионов *Cyclops kolensis* во время 2-3 деления дробления (до ДХ).

T (мин)	N	n	АХ/кл±SE
100 мг/л			
90	5	112	0,24±0,04
контроль	5	72	0
120	6	132	0,05±0,02
контроль	5	80	0
180	5	137	0,04±0,02
контроль	5	93	0

T – время экспозиции в растворе этопозиды, N – число самок с яйцевыми мешками; n – число исследованных анафаз и телофаз, АХ/кл – число аберраций хромосом (мосты и фрагменты) на одну клетку, SE – стандартная ошибка.

Снижение частоты АХ в клетках зародышей *C. kolensis* после ДХ может быть обусловлено редукцией последовательностей ДНК, связанных с ядерным матриксом (ЯМ) *C. kolensis*. Известно, что в этой части генома, составляющей около 1% всего генома, формируется 50% всех хромосомных мутаций, согласно Акифьеву с соавторами (1995). Закономерно, что если в результате ДХ из генома *C. kolensis* удаляется значительное число последовательностей ДНК, связанных с ЯМ, то после ДХ в эмбриональных клетках соматической линии *C. kolensis* должна уменьшиться частота АХ.

Чтобы обнаружить связь между чувствительностью клеток зародышей циклопов с ДХ и без ДХ, мы провели эксперименты по действию этопозиды на особи российской популяции вида *C. insignis*, ДХ у которого не наблюдается. Исследование зародышей *C. insignis*, помещенных в раствор этопозиды в концентрации 100 мкг/л на тех же стадиях развития, что и зародыши вида *C. kolensis* (Табл. 3), не обнаружило достоверной разницы в частоте АХ у этих видов на сходных стадиях развития.

Таблица 3.

Экспозиция эмбрионов *Cyclops insignis* в растворе этопозиды в концентрации 100мг/л.

Т (мин)	N	n	АХ/кл±SE
2-3 деления дробления			
90	6	104	0,08±0,03
контроль	5	81	0
5-7 деления дробления			
90	5	103	0,05±0,02
контроль	5	105	0,01
180	6	92	0,05±0,02
контроль	7	103	0

T – время экспозиции в растворе этопозиды, N – число самок с яйцевыми мешками; n – число исследованных анафаз и телофаз, АХ/кл – число аберраций хромосом (мосты и фрагменты) на одну клетку, SE – стандартная ошибка.

Следовательно, различия в чувствительности хромосом *C. kolensis* и *C. insignis* в ходе раннего эмбриогенеза не опосредованы особенностями эмбрионального развития и чувствительности клеток циклопов к действию этопозиды на ранних (2-3 деления дробления) и более поздних (5-7 деления дробления) стадиях эмбриогенеза, а являются следствием неравноценности до- и последиминуционного генома *C. kolensis*.

Проведенное исследование действия этопозиды на клетки зародышей *C. kolensis* следует рассматривать как первую попытку изучения воздействия химических мутагенов на хромосомный аппарат видов обладающих ДХ. Полученные данные позволяют обратить внимание на уникальный объект для исследования свойств геномов кардинально различающихся по величине и структуре вследствие ДХ, но принадлежащих одному и тому же организму.

Литература

1. Акифьев А.П., Худолий Г.А., Якименко А.В., Краснопевцев А.В., Хандогина Е.К. 1995. G1-процесс в лимфоцитах человека, культивируемых с ФГА, и образование радиационно-индуцированных аберраций хромосом. Генетика. Т. 31. №4. С. 485-491.
2. Гришанин А.К., Худолий Г.А., Шайхаев З.Г.О., Бродский В.Я., Макаров В.Б., Акифьев А.П. 1996. Диминуция хроматина у *Cyclops kolensis* и *Cyclops strenuus strenuus* (Copepoda, Crustacea) – уникальный пример генной инженерии в природе // Генетика. Т. 32. №4. С. 492-499.
3. Гришанин А.К., Шеховцов А.К., Бойкова Т.В., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф.. 2006. Проблема диминуции хроматина на рубеже XX и XXI веков // Цитология. Т. 48. № 5. С. 379-397.
4. Плохинский Н.А. 1970. Биометрия. М.: Изд-во МГУ. 367 с.
5. Тронов В.А., Конопляников Т.А., Никольская Т.А., Константинов Е.М. 1999. Апоптоз нестимулированных лимфоцитов человека и разрывы ДНК, индуцированные

Гришанин А. К., Гришанина Г. Э., Индукция хромосомных аберраций этопозидом у *cyclops kolensis* и *cyclops insignis* (copepoda, crustacea) // «Живые и биокосные системы». – 2015. – № 12; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-12/article-5>

- ингибитором топоизомеразы и этопозидом // Биохимия. Т. 64. № 3. С. 412-420.
6. Grishanin A.K., Akifyev A.P., Dahms H.U. 2004. Nuclear DNA and remarks on chromatin diminution of cyclopoid copepods // Zool. Studies. V. 43. № 2. P. 300-303.
 7. Fournel S., Genestier L., Rouault J.P., Lizard G., Flasher M., Assoussou O., Revillard J.P. 1995. Apoptosis without decrease of cell DNA content// FEBS Letter. V. 367. №2. P. 188-192.
 8. Schofer C., Weipoltshammer K. 2008. Gene dynamics and nuclear architecture during differentiation // Differentiation. V. 76. № 1. P. 41-56.
 9. Wang J.C. 1985. DNA topoisomerases // Ann Rev Biochem 54. P. 665-697.