

А.П. КРАВЕЦ¹, Т.А. МЮССЕ²,
Ж.А. ОМЕЛЬЧЕНКО¹, Г.С. ВЕНГЖЕН¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев,

² Университет Южной Каролины, Коламбия, США,
E-mail: kravetsap@yahoo.com

ДИНАМИКА ЧАСТОТЫ ГОНАДАЛЬНОГО ДИСГЕНЕЗА У *DROSOPHILA MELANOGASTER* В КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ



Изучены динамика частоты гибридного дисгенеза у F₁ потомков двух линий Drosophila melanogaster (линий Canton-S и radius incompletus (ri), содержащих Р-мобильный элемент), которые в течение 20 поколений находились в условиях хронического облучения с тремя мощностями доз (1,2 · 10⁻⁸; 0,3 · 10⁻⁸; 0,12 · 10⁻⁸ Гр/с). Показано постепенное изменение дозовых зависимостей частоты гибридного дисгенеза для F₁ потомков каждого из 20 поколений облучаемых родителей. Выявлена сложная динамика переходного процесса проявления гонадального дисгенеза в зависимости от продолжительности облучения предков и мощности дозы. Кумулятивный эффект пролонгированного облучения проявляется в виде адаптации при наименьшей мощности облучения и истощения для наибольшей из использованных мощностей дозы. Обсуждается вопрос об особенностях переходного процесса, а также включения иерархии защитных и приспособительных реакций в условиях хронического действия радиационного фактора.

© А.П. КРАВЕЦ, Т.А. МЮССЕ, Ж.А. ОМЕЛЬЧЕНКО,
Г.С. ВЕНГЖЕН, 2010

Введение. Освоение атомной энергии привело к возникновению разнообразных вариантов облучения человека и биоты. Из-за влияния множества факторов биологической и небиологической природы самой сложной оказалась проблема оценки последствий хронического облучения с малой мощностью дозы. Отмечено широкое разнообразие эффектов, в которых прямо или косвенно проявляются не только кумуляция повреждений, но и уже существующие защитные и приспособительные механизмы, их чувствительность и «емкость», а также, возможно, процессы самоорганизации, которые могут привести к возникновению новых защитных и адаптивных механизмов. Многочисленные данные свидетельствуют как о возможности адаптации к пролонгированному облучению [1], так и об ее отсутствии [2, 3] и возникновении явлений истощения организма [4, 5]. Однако большинство данных, полученных в полевых условиях, не дают количественных оценок дозовых зависимостей явлений, а также не позволяют определить временную структуру индуцируемых событий и их характеристические времена. В настоящее время количественные оценки скорости и направленности изменений биологической эффективности пролонгированного облучения, а также характеристических времен этих изменений [2, 4] для различных организмов и процессов весьма ограничены.

Изучение последствий облучения выявило разнообразные эффекты, которые в настоящее время объединяются под названием генетической или геномной нестабильности [6, 7], молекулярные механизмы возникновения которой могут быть так же разнообразны, как и проявления. Весьма неоднозначным может быть и биологическое значение этих эффектов. Известно, что некоторые эффекты генетической нестабильности рассматриваются и как биомаркер радиационного воздействия и повреждения [8], и как базовый механизм расширения генетического разнообразия [9] для действия отбора, самоорганизации живого и возникновения новых защитных механизмов.

Прежде чем эффекты генетической нестабильности были осознаны как радиобиологический феномен, ряд их молекулярных аспектов и действующих факторов был обнаружен и изучен генетиками. После того как в конце 40-х годов мобильные элементы, т.е. часть генома, способная изменять в геноме свое мес-

тоположение и копияность, были обнаружены у кукурузы, исследования показали, что практически все организмы, включая человека, обладают такой подвижной частью генома [9–11]. В настоящее время надежно установлено, что до 80 % спонтанных мутаций у дрозофилы связано с активизацией мобильных элементов [10–13]. Разнообразные стрессовые воздействия, в том числе облучение, приводят к активизации некоторых мобильных элементов [10, 14, 15]. Молекулярные механизмы активизации мобильных элементов стрессовыми воздействиями не вполне ясны, но, возможно, они реализуются через нарушения целостности ДНК и повышения частоты двойных разрывов [10], что уже достоверно показано при миграции и внедрении в ядерную ДНК митохондриальной [16].

Известно, что *Drosophila melanogaster* является наиболее исследованным в генетическом отношении объектом. Как и у других прокариотических и эукариотических организмов, геном дрозофилы содержит мобильные элементы, активация которых под влиянием факторов среды [10, 11–13], включая радиационное воздействие [14, 15], приводит к геномной нестабильности и повышению вероятности мутаций. Р-мобильные элементы принадлежат к одному из трех семейств транспозонов (два других – это Нобо и I-семейства), активация которых обуславливает гонадальный дисгенез *Drosophila melanogaster*.

Р-мобильный элемент принадлежит к классу ДНК транспозонов, так называемых TIR (*tandem inverted repeats*) элементов [12–14]. Два других семейства мобильных элементов дрозофилы – *hobo*-транспозоны и *I*-транспозоны – также обуславливают сходные эффекты у данного вида, однако редукция гонад наблюдается только в системах Р–М и Н–Е гибридного дисгенеза. Когда самец, геном которого содержит Р-элемент (Р-цитотип), спаривается с самкой, чей геном не имеет его (М-цитотип), развивается типичный так называемый Р–М гибридный дисгенез, который характеризуется редукцией гонад (гонадальный дисгенез) и наличием рекомбинационных событий, не наблюдающихся у самцов в норме [12, 13]. Таким образом, об активности Р-мобильного элемента можно судить по недоразвитию

или отсутствию у потомков этих линий одной или обеих гонад. В наших исследованиях такая модель генетической нестабильности была использована в лабораторных условиях хронического облучения с контролируемой дозиметрией.

Целью исследований была проверка гипотезы об изменении радиочувствительности процесса активизации мобильного элемента в условиях пролонгированного облучения, оценка направленности этих изменений в зависимости от накопленной дозы и их характеристических времен.

Материал и метод. В качестве экспериментального объекта нами использованы две лабораторные линии дрозофилы – линия Canton-S, долго поддерживаемая в лабораторных условиях и не содержащая мобильный элемент этого типа, и *ri*-линия, содержащая Р-мобильный элемент. Хроническое облучение линий проводили в условиях контролируемой дозиметрии. Три виргинные самки линии Canton-S объединяли в пробирке со средой с двумя самцами *ri*-линии. Активность Р-мобильного элемента оценивали по уровню гонадального дисгенеза в поколении F₁. Параллельно проводили контрольные М × М и Р × Р скрещивания, которые показали отсутствие гонадального дисгенеза у потомков М × М скрещивания как в контроле, так и в условиях хронического облучения. Для потомков Р × Р скрещивания этот показатель в контроле колебался от 5 до 8 % у самцов и от 10 до 15 % у самок, а за 20 поколений в условиях хронического облучения возрос до 45 % у самок *ri*-линии.

Источником пролонгированного облучения был сосуд с раствором соли ¹³⁷CsCl, расположенный в центре штатива с концентрическими щелями для фиксации пробирок с мухами. В настоящей работе приведены результаты, полученные при облучении с начальной мощностью дозы $1,2 \cdot 10^{-8}$, $0,3 \cdot 10^{-8}$; $0,12 \cdot 10^{-8}$ Гр/с. Мухи находились в стеклянных сосудах 50 мл, объем стандартной питательной среды составлял 10 мл. Хроническое облучение проводили в течение 20 поколений при температуре 21–22 °С.

При хроническом облучении обоих родителей изучали гонадальный дисгенез их потомков в F₁ поколении. Асимметрию по размеру го-

над оценивали визуально на 50 индивидуумах каждого пола, полученных от облучаемых родителей. Гонадальный дисгенез рассматривался как 0, если обе гонады были полноценны морфологически, как 1 (GD (1)), если одна гонада была недоразвита или вообще отсутствовала, и 2 (GD (2)), если обе гонады были уменьшены или отсутствовали. Из четырех пробирок отбирали по 50 самцов и самок и оценивали частоту гонадального дисгенеза для каждой популяции. Процент гибридного дисгенеза рассчитывали по формуле

$$\% \text{GD} = 1/2 \% \text{GD}(1) + \% \text{GD}(2).$$

Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по параметрическому t-критерию Стьюдента при уровне значимости 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение. Дозовые зависимости получены для каждого F₁ поколения потомков каждого из 20 исследованных поколений линий Canton-S и *ri*. При изучении эффектов непрерывного облучения последовательных поколений организмов возникает вопрос о принципах оценки накопленных доз. Несомненно, что каждое последующее поколение испытывает на себе влияние облучения, полученного всеми предыдущими поколениями. Исследование постепенной, из поколения в поколение, трансформации дозовых зависимостей показывает различное изменение радиочувствительности организма в зависимости от предыстории его облучения, или, иными словами, накопленной дозы облучения его предков. Таким образом, уже сам характер трансформации дозовых зависимостей несет в себе информацию о накопленной дозе всеми предыдущими поколениями, и в связи с этим вполне допустимо построение зависимостей как от дозы, накопленной только текущим поколением, так и от дозы, накопленной текущим поколением и всеми его предками. В настоящей работе приводятся зависимости от дозы, накопленной текущим поколением. Зависимости, которые построены для доз, накопленных за одно поколение родителей, показывают постепенное изменение чувствительности в определенном интервале доз и для всего диапазона исследованных доз. На рис. 1 и 2 представлены дозовые зависимости гонадального дисгенеза у F₁ потомков первого по-

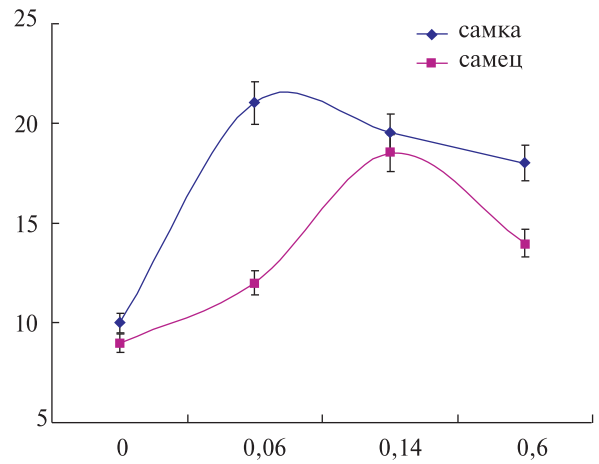


Рис. 1. Дозовая зависимость частоты гонадального дисгенеза (по вертикали, %) для потомков F₁ первого поколения облучаемых родителей (Canton-S × *ri*-линия); по горизонтали — доза, накопленная за первое поколение, Гр

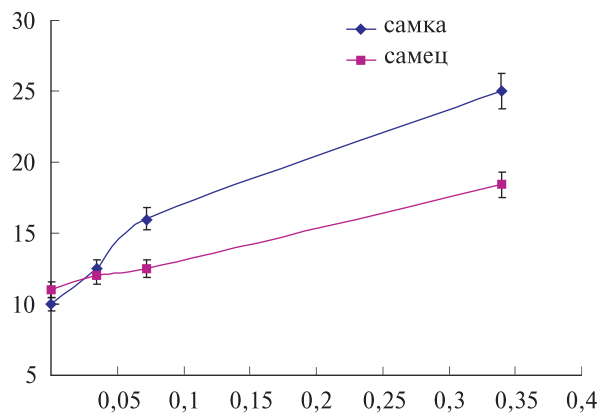


Рис. 2. Дозовая зависимость частоты гонадального дисгенеза (по вертикали, %) для потомков F₁ 20-го поколения облучаемых родителей (Canton-S × *ri*-линия); по горизонтали — доза, накопленная за 20-е поколение, Гр

коления облучаемых родителей и F₁ потомков 20-го поколения. Сопоставление этих графиков свидетельствует о значительных перестройках дозовой зависимости и радиочувствительности во всем диапазоне исследуемых доз. Если дозовая зависимость для первого поколения как самцов, так и самок облучаемых родителей имеет характерный для действия малых доз немонокотонный характер, то к 20-му поколению зависимость становится монотонной, что

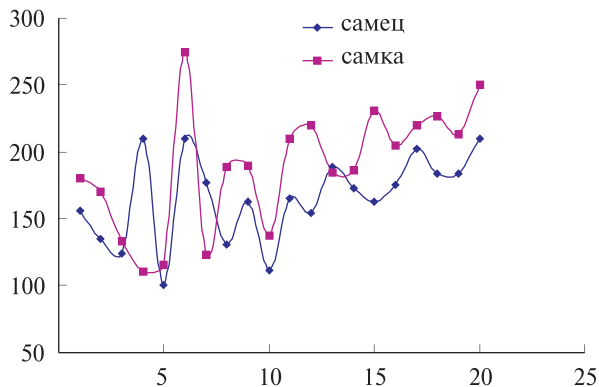


Рис. 3. Динамика частоты гонадального дисгенеза (по вертикали, % от контроля) потомков F₁ в зависимости от числа поколений облучаемых предков, мощность дозы $1,2 \cdot 10^{-8}$ Гр/с, по горизонтали — поколение

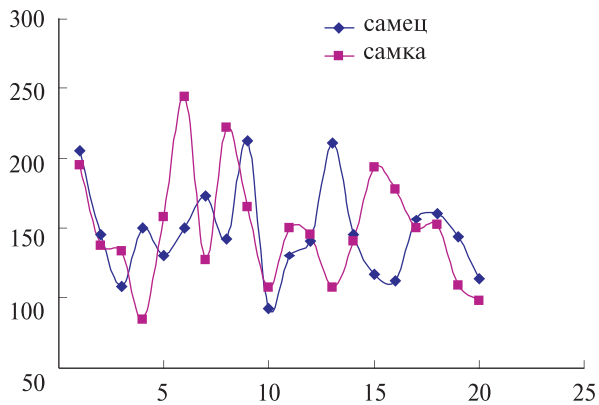


Рис. 4. Динамика частоты гонадального дисгенеза (по вертикали, % от контроля) потомков F₁ в зависимости от числа поколений облучаемых предков, мощность дозы $0,3 \cdot 10^{-8}$ Гр/с, по горизонтали — поколение

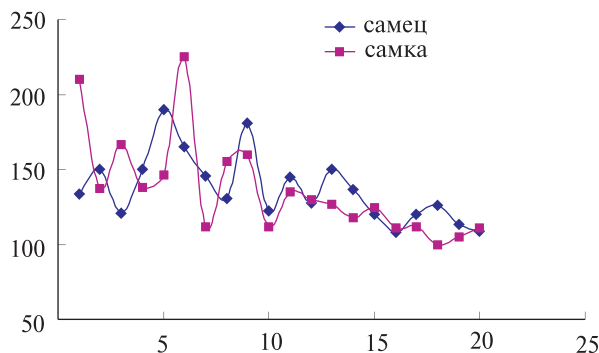


Рис. 5. Динамика частоты гонадального дисгенеза (по вертикали, % от контроля) потомков F₁ в зависимости от числа поколений облучаемых предков, мощность дозы $0,12 \cdot 10^{-8}$ Гр/с, по горизонтали — поколение

свидетельствует о повышении радиочувствительности в диапазоне больших мощности и доз и о некотором снижении радиочувствительности (адаптация) в области самых малых доз.

На рис. 3–5 представлена динамика частоты гонадального дисгенеза при разной мощности дозы хронического облучения (процент от контроля). Зависимость имеет колебательный характер, причем для мощностей облучения $0,12 \cdot 10^{-8}$ и $1,2 \cdot 10^{-8}$ Гр/с фиксировали определенный тренд этих зависимостей. Для минимальной мощности дозы наблюдали постепенное снижение частоты гонадального дисгенеза, т.е. слабо выраженную адаптацию, а для максимальной из использованных мощностей доз — столь же незначительное повышение частоты дисгенеза, т.е. рост радиочувствительности. Для этого же объекта в другом исследовании было выявлено изменение при хроническом облучении продолжительности жизни в колебательном режиме [18], что, возможно, также имеет сходный механизм возникновения.

Известно, что колебательная кинетика типична для систем с отрицательной обратной связью и является неотъемлемой, завершающей частью гомеостатической кривой [19]. Она свидетельствует о своего рода перерегулировании в работе восстановительных процессов. Это явление хорошо изучено для технических и живых систем при однократном действии «возмущения» или стрессового фактора [19]. Следует ожидать, что типичный вид гомеостатической кривой, имеющей один четко выраженный пессимум и серию затухающих колебаний на восходящей ветви кривой, будет значительно видоизменен для условий постоянно действующего стрессового фактора. Объединение данных, полученных при оценке постепенного изменения дозовых зависимостей и динамики частоты гонадального дисгенеза, позволяет сформулировать предположение о проявлении иерархии восстановительных и защитных механизмов в данном конкретном примере.

Обобщение имеющихся данных об адаптивных изменениях показывает существование широкого разброса как времени индукции этой реакции, так и сохранения изменений (повышения) радиоустойчивости во времени [19, 20].

Существует представление о трех основных временных формах стратегии биохимической

адаптации [20]. Во-первых, это так называемая немедленная адаптация, которая основана на особенностях, заложенных в самих метаболических сетях как системах с отрицательными обратными связями, и, возможно, использующая конститутивную их часть. По отношению к радиационному воздействию это может быть усиление активности функционирования конститутивных антиоксидантных систем и конститутивной части репарационных систем ДНК. Именно эти эффекты хорошо изучены в настоящее время под именем адаптивного ответа (АО), характеристические времена которого занимают время от минут до нескольких часов [20]. Следующим этапом во временной иерархии есть то, что называется акклимацией, или акклиматизацией, и требует времени, по порядку величин сравнимого с продолжительностью жизни индивида. И, наконец, самая медленная форма — это эволюционная адаптация, являющаяся наиболее длительным процессом приспособления к факторам (фактору). Этот процесс самоорганизации связан с возникновением новой генетической информации, детерминирующей новые адаптивные фенотипические признаки, требует многих поколений и может быть отнесен к микроэволюционным процессам. Упомянутая феноменологическая классификация адаптивных процессов [20] была предложена более двух десятилетий назад и с точки зрения современных представлений может быть дополнена сведениями о эпигенетической регуляции, «выборе» эпигенома, основанном на конкуренции между продуктами отдельных локусов и аллелей [21], когда изменение чувствительности влечет переключение метаболизма через изменение паттернов метилирования ДНК. Тогда вторая по скорости форма адаптации могла бы быть отнесена к разряду эпигенетической адаптации.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что за 20 поколений переходный процесс изменения радиочувствительности процесса активизации Р-мобильного элемента не заканчивается: частота гонадального дисгенеза не выходит на новый стационарный уровень. Это является косвенным показателем скорости перестройки структуры ядерного хроматина и изменений темпов глобального повреждения ДНК. Кинетические особенности

переходного процесса позволяют считать, что в данном случае оказываются задействованы по крайней мере две формы, две группы механизмов изменений радиочувствительности, различающихся по скорости. Первая группа механизмов может быть связана с конститутивной составляющей защитных реакций клетки. Вторая, более медленная, компонента может затрагивать перестройку эпигенетической программы индивида, химическую трансформацию ДНК, возможно связанную с различным уровнем ее метилирования.

*Авторы статьи выражают благодарность И.А. Козерецкой, доценту Национального университета им. Т.Г. Шевченко, за предоставленные линии *Drosophila melanogaster* и участие в обсуждении полученных данных.*

*A.P. Kravets, T.A. Mousseau,
Zh. A. Omel'chenko, G.S. Vengjen*

DYNAMICS OF HYBRID DYSGENESIS
FREQUENCY IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN
CONTROLLED TERMS OF PROTRACTED
RADIATION EXPOSURE

Two *Drosophila melanogaster* strains (Canton-S and *ri*-lines) for 20 generations were in the controlled terms of chronic irradiation with 3-dose rate ($1,2 \cdot 10^{-8}$; $0,3 \cdot 10^{-8}$; $0,12 \cdot 10^{-8}$ Gy/c). The dynamics of hybrid dysgenesis frequency was explored for each generation of F₁ descendants from Canton-S and *ri*-lines crossing. The gradual change of dose response of hybrid dispense depending on duration of irradiation of ancestors and dose rate was shown. The complex dynamics of hybrid dysgenesis frequency depending on irradiation duration of ancestors and dose rate was detected. The cumulative effect of the prolonged irradiation shows up as adaptation at the lowest dose rate and as exhaustion at the highest dose rate. Question comes into discussion about the features of transitional process and including of protective and adaptive reactions hierarchy at the conditions of radiation factor chronic action.

*О.П. Кравець, Т.А. Мюссе,
Ж.А. Омельченко, Г.С. Венгжен*

ДИНАМІКА ЧАСТОТИ ГОНОДАЛЬНОГО
ДИСГЕНЕЗУ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*
В КОНТРОЛЬОВАНИХ УМОВАХ
ХРОНІЧНОГО ОПРОМІНЕННЯ

Досліджено динаміку частоти гібридного дисгенезу у нащадків F₁ двох ліній *Drosophila melanogaster* (ліній Canton-S та *ri*), що вміщують Р-мобільний елемент), які впродовж 20 поколінь знахо-

дились в умовах хронічного опромінення з трьома потужностями доз ($1,2 \cdot 10^{-8}$; $0,6 \cdot 10^{-8}$; $0,12 \cdot 10^{-8}$ Гр/с). Показана поступова зміна дозових залежностей частоти гібридного дисгенезу для нащадків F_1 кожного з 20 поколінь опромінених батьків. Виявлено складну динаміку перехідного процесу проявлення гонадального дисгенезу в залежності від тривалості опромінення предків та потужності дози. Кумулятивний ефект пролонгованого опромінення проявляється у вигляді адаптації за найменшої потужності опромінення та виснаження для найбільшої з використаних потужностей дози. Обговорюється питання щодо особливостей перехідного процесу, а також включення ієрархії захисних та пристосувальних реакцій в умовах хронічної дії радіаційного фактора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bedford J.S., Dewey W.C.* Historical and current highlights in radiation biology: has anything important been learned by irradiated cells? // *Radiat. Res.* – 2002. – **158**. – P. 251–291.
2. *Шафиркин А.В., Горлов В.Г.* Модельное описание кинетики эффективного поражения организма при протяженных и хронических лучевых воздействиях // *Радиобиология.* – 1978. – **18**. – С. 253–258.
3. *Гераськин С.А., Евсеева Т.Е., Таскаев А.И., Майстренко Т.А., Михайлик Б.* Биологические эффекты у растений и животных, обитающих на севере России, в районах с повышенным уровнем естественной радиоактивности // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2007. – **47**. – С. 34–53.
4. *Васин А.Л., Шафиркин А.В.* Количественные критерии перехода от нормы к патологии при хроническом действии физических факторов // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2006. – **46**. – С. 498–507.
5. *Пелевина И.И., Готлиб В.Я., Конрадов Ф.Ф.* 20 лет изучения последствий Чернобыльской аварии – это много или мало для оценки их характера и масштабов? // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2006. – **46**. – С. 240–248.
6. *Мазурик В.К., Михайлов В.М.* Радиационно-индуцированная нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2001. – **41**. – С. 272–289.
7. *Бурлакова Е.Б., Михайлов В.М., Мазурик В.К.* Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2001. – **41**. – С. 489–499.
8. *Brooks A.L.* Biomarkers of exposure and dose // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2001. – **97**. – P. 39–46.
9. *Голубовский М.Д.* Век генетики: эволюция идей и понятий. – СПб.: Борей Арт, 2000. – 262 с.
10. *Ратнер В.А., Васильева Л.А.* Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // *Сорос. образоват. журн.* – 2000. – **6**. – С. 14–20.
11. *Gvozdev V.A.* Mobile DNA of eukaryotes. 1. Molecular structures, modes of transposition and maintenance of chromosome integrity // *Soros Educat. J.* – 1998. – **8**. – P. 8–21.
12. *Engels W.R., Preston C.R.* Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. The biology of male and female sterility // *Genetics.* – 1979. – **92**. – P. 161–175.
13. *Engels W.R., Johnson-Schlitz D.M., Eggleston W.B., Sved J.* High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog-dependent // *Cell.* – 1990. – **62**. – P. 515–525.
14. *Handler A.M., Gomez S.P.* P element excision in *Drosophila* is stimulated by gamma-irradiation in transient embryonic assays // *Genet. Res. Caqmb.* – 1997. – **70**. – P. 75–78.
15. *Зайнулин В.Г., Москалев А.А., Шапочников М.В., Юшкова Е.А., Таскаев А.И.* Генетические аспекты облучения в малых дозах лабораторных линий и экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2006. – **46**. – С. 547–554.
16. *Газиев А.И., Шайхаев Г.О.* Ионизирующая радиация может активировать встраивание фрагментов митохондриальной ДНК в ядерный геном // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2007. – **47**. – С. 673–683.
17. *Москалев А.А., Зайнулин В.Г.* Продолжительность жизни в поколениях хронического облучения у изогенных и гетерогенных линий дрозофилы дикого типа // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2006. – **46**. – С. 436–440.
18. *Новосельцев В.Н.* Теория управления и биосистемы. Анализ сохранительных свойств. – М.: Наука, 1978. – 314 с.
19. *Бондарчук И.А.* Гипотеза о механизме индукции адаптивного ответа при облучении клеток млекопитающих в малых дозах // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2002. – **42**. – С. 36–43
20. *Хочачка П., Сомеро Дж.* Стратегия биохимической адаптации. – М.: Мир, 1977. – 384 с.
21. *Лекявичус Э.* Элементы общей теории адаптации. – Вильнюс : Моклас, 1986. – 272 с.

Поступила 03.03.09