

И.А. КОЗЕРЕЦКАЯ¹, А.В. ПРОЦЕНКО¹,
Е.С. АФАНАСЬЕВА¹, С.Р. РУШКОВСКИЙ¹,
А.И. ЧУБА¹, Т.А. МЮССЕ², А.П. МЕЛЛЕР³

¹ Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Украина
E-mail: kozer@mail.univ.kiev.ua

² Университет Южная Каролина, Колумбия, США

³ Университет Пьера и Марии Кюри, Париж, Франция

МУТАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *DROSOPHILA* И *HIRUNDO RUSTICA* С РАДИАЦИОННО-ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ УКРАИНЫ



Исследованы природные популяции Drosophila melanogaster и Hirundo rustica с территорий Украины, имеющих различный уровень радиационного загрязнения. Генетический мониторинг осуществляли по таким показателям, как частота видимых мутаций, сцепленных с полом мутаций, частота редукции гонад у дрозофил и интерфазных проявлений хромосомной нестабильности в эритроцитах птиц. Полученные результаты свидетельствуют о возможной обратной зависимости уровня хромосомной нестабильности у ласточек и частоты летальных мутаций в половой хромосоме дрозофил от плотности радиоактивного загрязнения.

© И.А. КОЗЕРЕЦКАЯ, А.В. ПРОЦЕНКО, Е.С. АФАНАСЬЕВА,
С.Р. РУШКОВСКИЙ, А.И. ЧУБА, Т.А. МЮССЕ,
А.П. МЕЛЛЕР, 2008

Введение. Прошло более 20 лет с момента аварии на Чернобыльской атомной электростанции. На протяжении этих лет проведено огромное количество научно-исследовательских работ учеными разных стран в самых различных направлениях с целью ответить на самый важный для человечества вопрос: каковы последствия этого неординарного события? Официальная позиция ООН [1] состоит в том, что последствия аварии для здоровья человека оказались значительно меньше ожидаемых. В зоне отчуждения ЧАЭС наблюдается увеличение численности животных, что трактуется как восстановление природных экосистем. Такие суждения возникли по нескольким причинам: 1) большинство исследований проведены в лабораторных условиях, что не позволяет перенести их результаты на популяционные процессы, именно поэтому они не включаются в отчеты официальных организаций [2]; 2) в радиобиологических исследованиях недостаточно используются классические модельные объекты, тогда как только применение всесторонне исследованных видов живых организмов позволяет получать достоверный результат (исключения составляют мыши [3]); 3) результаты научных исследований зачастую противоречивы, что можно объяснить особенностями исследуемых объектов и разнообразием применяемых методик [4].

Огромные территории России, Украины, Беларуси и других европейских стран подверглись загрязнению долгоживущими радиоактивными изотопами вследствие аварии на ЧАЭС. Это значит, что множество популяций животных, растений, а также человека существуют в условиях хронического низкодозового радиоактивного загрязнения, генетические последствия которого для большинства видов вообще не изучались, а для изучаемых видов их результаты противоречивы.

Целью настоящего исследования было изучение мутационных процессов в природных популяциях модельных организмов (*Drosophila melanogaster* и *Hirundo rustica*), которые отражают генетические последствия хронических низкодозовых облучений в комплексе с другими факторами загрязнения окружающей среды.

Материалы и методы. *Drosophila melanogaster* является видом-космополитом, широко представленным в местах сбора материала, а также классическим модельным объектом. В лабо-

раторных условиях мух разводили на стандартной среде [5]. Продолжительность развития особи от фазы яйца до имаго при оптимальных температурах составила приблизительно 2 нед.

Ласточка деревенская, *Hirundo rustica*, маленькая птица (≈ 20 г) из отряда воробьиных, которая питается насекомыми, главным образом *Diptera* и *Hymenoptera*, пойманными на лету. Самцы и самки строят гнезда на (или внутри) постройках человека, самка откладывает обычно 4–5 яиц. Более половины самок могут отложить повторную кладку. Деревенские ласточки живут одиночно или в колониях, которые могут превышать 120 пар. Деревенские ласточки Украины зимуют в Южной Африке, где у них происходит полная линька.

Мазки крови ласточек и особи дрозофил получены летом 2005 г. Для исследования избраны регионы с разным уровнем радиационного загрязнения. Так, сбор мух проводился в трех точках вблизи Чернобыльской АЭС с уровнем радиоактивного загрязнения 5; 12,5; 55,5 Ки/м² соответственно, а также на территории городов Киев, Одесса, Умань, Лубны, Пирятин и Болонья (Италия).

Ласточек отлавливали на территориях трех поселков Киевской области, различающихся по уровню радиоактивного загрязнения: 1) с. Пески Иванковского района на границе зоны отчуждения ЧАЭС (48 птиц), средняя плотность загрязнения радиоактивными изотопами по ¹³⁷Cs – 151 кБк/м², ⁹⁰Sr – 47,7 кБк/м², ²³⁹Pu – 0,909 кБк/м²; 2) с. Дитятки Иванковского района на границе зоны отчуждения ЧАЭС (44 особи), средняя плотность загрязнения радиоактивными изотопами по ¹³⁷Cs – 148 кБк/м², ⁹⁰Sr – 40,3 кБк/м², ²³⁹Pu – 0,557 кБк/м²; 3) с. Жовтневе Бородянского района было выбрано в качестве контрольной, условно «чистой» территории (21 птица), средняя плотность загрязнения радиоактивными изотопами по ¹³⁷Cs – 26 кБк/м², ⁹⁰Sr – 4,7 кБк/м², ²³⁹Pu – 0,084 кБк/м². Всего для исследования было отобрано 113 птиц.

Видимые мутации изучали путем просмотра пяти поколений инбредных линий, полученных путем индивидуальных скрещиваний от 30 самок из каждой природной популяции. Для оценки спонтанного уровня летальных сцепленных с полом мутаций самцов из природных популяций скрещивали с самками ли-

нии *C(1)DX* и в первом поколении оценивали соотношение полов, сравнивая его с контрольным по методу χ^2 [6].

Наличие гибридного дисгенеза (gonadal dysgenesis assay, GD) определяли по состоянию выделенных гонад, визуально оценивая степень их развития. Учитывали только одно- и двустороннюю редукцию яичников и семенников. Проанализировано по 50 особей каждого пола для всех популяций и лабораторной линии *Canton S*. Частоту GD вычисляли по формуле

$$\%GD = S \%GD(1) + \%GD(2),$$

где %GD(1) – процент особей с одним редуцированным яичником/семенником; %GD(2) – с двусторонней редукцией гонад.

Для оценки стойкости мух к радиационному воздействию через пять поколений лабораторного разведения мух из популяций ЧАЭС (55,5 Ки/м²) и Болонья были отобраны самцы возрастом 24 ч. На этих самцов воздействовали γ -лучами в дозе 30 Гр, которая, как считается, вызывает максимальное количество изменений в геноме при минимальной гибели организмов. Мощность облучения составила 0,017 Гр/с при комнатной температуре (установка для γ -облучения «Исследователь», источник ⁶⁰Co). После этого облученных самцов скрещивали с самками линии *C(1)DX* и в первом поколении оценивали соотношение полов, сравнивая его с контрольным по методу χ^2 .

Кровь брали из подкрыловой вены. Мазки подсушивали на открытом воздухе и окрашивали 5 мин в готовом красителе-фиксаторе Май-Грюнвальда. Доокраску проводили 4%-ным водным раствором красителя Романовского-Гимза 40 мин. Такое сочетание позволяет получить хорошую прокраску ядер и дифференцированную окраску гранул в гранулоцитах.

При микроскопировании препаратов регистрировали частоту эритроцитов с микроядрами (МЯ) и описанными нами ранее [7] ядерными аномалиями: «хвостатыми» ядрами (ХЯ) и «почкующимися» ядрами (ПЯ). Двухлопастные ядра (ДЛЯ) и двухъядерные эритроциты (ДЭ) были выбраны в качестве показателей нарушения митоза и объединены в единый параметр в силу строгой взаимозависимости изменений этих маркеров. Микро-

ядра, хвостатые ядра, почкующиеся ядра и двухъядерные клетки являются классическими показателями хромосомной нестабильности и поэтому рекомендованы для ее оценки [8]. Просчитывали по 10 000 эритроцитов на каждом препарате, учитывали только зрелые и неповрежденные эритроциты.

Статистический анализ проводили стандартными методами [6].

Результаты исследований и их обсуждение.

В различных районах Украины были собраны выборки, размер которых соответствует плотности популяций *D. melanogaster* в этих местах (таблица). Выборка итальянской популяции представлена переданными для анализа мухами и, возможно, не отражает реальных параметров этой популяции.

Ни в одной из природных популяций не было обнаружено видимых мутаций. С одной стороны, это может быть связано с объемами выборок, так как по данным Гершензона [9] частота видимых мутаций в киевской популяции в 1937–1947 гг. составляла 0,25 %, и, следовательно, наша выборка слишком мала. С другой стороны, частота видимых мутаций в популяции г. Умань в разные годы колебалась от 0,17 % (1930–1940 гг.) [9] до 0,9 % (1981–1991 гг.) [10], и, следовательно, это позволяет сделать вывод, что в 2005 г. частота видимых мутаций в этой популяции была меньше, чем в упомянутые годы. Можно предположить, что на момент исследования эти популяции не находились в состоянии мутационной вспышки.

Как известно, 80 % спонтанных мутаций у вида *D. melanogaster* обуславливается активностью мобильных элементов [11]. Одним из признаков этой активности является частота редукции гонад у дрозофил. В наших исследованиях этот показатель колебался от 0 (что не позволяет учесть таковую, если она меньше 1 %) до 23 ± 6 %. Такой уровень редукции гонад позволяет сделать вывод о том, что во всех изученных популяциях, включая лабораторную линию дикого типа *Canton S*, активность мобильных элементов мы не наблюдали, хотя следует отметить, что само явление редукции гонад в популяциях Одессы, Чернобыля, Пирятин и Лубнов чаще отмечалось у самок.

Результат анализа редукции гонад обоих полов косвенно подтверждает низкую частоту

Количество пойманных в природе особей *Drosophila melanogaster*

Природная популяция	Самцы	Самки
Киев	208	138
Умань	478	704
Одесса	621	497
Чернобыль (город), 5 Ки/м ²	80	70
Чернобыль, 12,5 Ки/м ²	34	51
Чернобыль, 55,5 Ки/м ²	41	35
Лубны	226	597
Пирятин	484	723
Италия	139	94

видимых мутаций в изученных популяциях, так как ранее было показано для уманской популяции, что мутационные вспышки сопровождаются встраиванием мобильных элементов (*P. hobo*) в определенные локусы генома *D. melanogaster* [12].

Следующим этапом работы стало исследование уровня летальных мутаций в X-хромосоме дрозофил. Наши результаты показывают, что лишь в природных популяциях Лубнов и Пирятин уровень сцепленных с полом летальных мутаций статистически достоверно превышает контрольный ($\chi^2_{\text{(Лубны)}} = 5,4$, $p > 0,50$, $\chi^2_{\text{(Пирятин)}} = 4,02$, $p > 0,50$), а в популяциях Киева, Чернобыля, Умани, Одессы, Болоньи этот показатель был на уровне контрольного.

В дальнейшем самцы из потомства особей, собранных в Чернобыле и Болонье, были остро облучены γ -лучами в дозе 30 Гр. После этого их протестировали на наличие летальных мутаций в X-хромосоме. Оказалось, что у особей из популяции Болоньи наблюдалось статистически достоверное повышение уровня летальных мутаций, в то время как у особей из чернобыльской оно отсутствовало.

При переходе к разведению популяций в культуре наблюдалось возрастание выхода частоты мутаций в поколениях, при этом в двух популяциях (Пирятин, Чернобыль – 55,5 Ки/м²) отмечено монотонное увеличение этого показателя. В остальных популяциях этот процесс был скачкообразным – наряду с поколениями, в которых наблюдалось увеличение частоты мутаций, были поколения, в которых мутации вообще не зарегистрированы. Следует подчеркнуть, что в пятом поколении частота мутаций

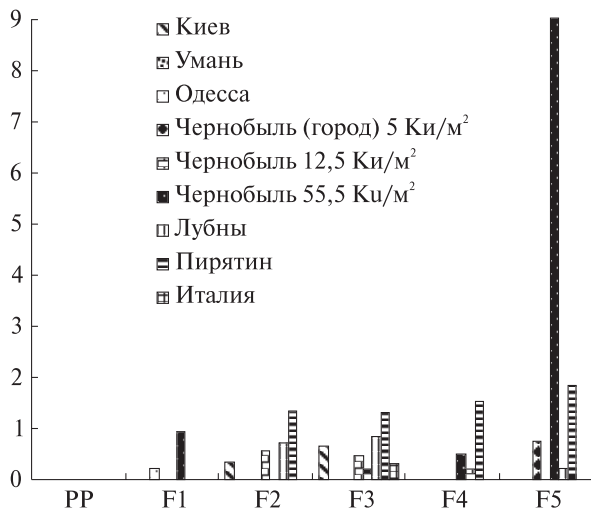


Рис. 1. Частота мутаций (по вертикали, %) в пяти поколениях лабораторного разведения: PP – родительское поколение, F1 – F5 – дочерние поколения

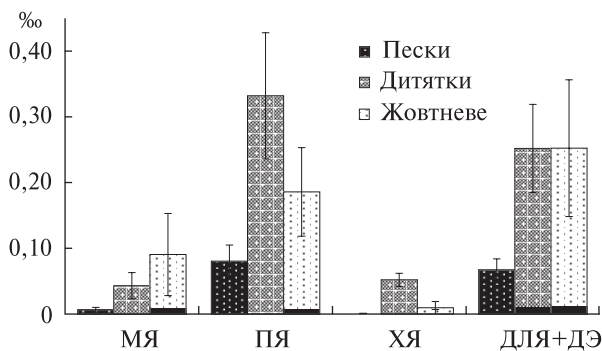


Рис. 2. Уровни параметров хромосомной нестабильности у ласточек на территориях с различными уровнями радиоактивного загрязнения: МЯ – микроядра, ПЯ – «почкующиеся» ядра, ДЛЯ – двухлопастные ядра, ХЯ – «хвостатые» ядра, ДЭ – двухъядерные эритроциты

в чернобыльской популяции (55,5 Ки /м²) возросла на целый порядок (рис. 1).

У дрозофил всех исследованных популяций найдены следующие мутации: изменения цвета глаз, нарушения склеротизации брюшка, «волдыри на крыльях», изменения жилкования. Следует отметить, что спектр мутаций киевской популяции во многом совпадал с описанным Гершензоном с соавт. [9], однако некоторые типы мутаций мы не наблюдали в процессе пяти поколений близкородственных скрещиваний. Так, нами отмечено сужение спектра

окраски глаз, уменьшение разнообразия изменений жилкования крыльев. Ранее [10, 13–15] для уманской популяции неоднократно были описаны мутации *yellow*, *singed* и *abnormal abdomen*, однако в наших экспериментах особи с подобными изменениями фенотипа нами не обнаружены ни в одном из поколений разведения уманской популяции в культуре.

Частота всех изученных параметров хромосомной нестабильности у ласточек находилась на достаточно низком уровне, что характерно для всех проанализированных нами ранее видов птиц [16]. В большинстве исследований основным интерфазным показателем наличия мутагенной нагрузки и, соответственно, уровня хромосомной нестабильности являются микроядра. Частота этого показателя составляла $0,007 \pm 0,004 \text{ ‰}$ в популяции ласточек с интенсивно загрязненной территории (с. Пески), $0,043 \pm 0,020 \text{ ‰}$ – со среднезагрязненной территории (с. Дитятки), тогда как в популяции птиц с условно чистой территории (с. Жовтневе) она достигала $0,090 \pm 0,062 \text{ ‰}$. Несмотря на явную тенденцию снижения частоты микроядер при повышении степени загрязнения, различия между популяциями по данному параметру были статистически незначимыми (рис. 2).

Дополнительные параметры, отображающие наличие химической («почкующиеся» ядра) или физической («хвостатые» ядра) мутагенной нагрузки также оценивались в трех популяциях ласточек. Самым низким уровнем указанных параметров характеризовались ласточки из с. Пески (рис. 2). Различия этих параметров были статистически достоверны для обоих параметров ($p < 0,05$) при сравнении их со значениями, полученными для птиц из среднезагрязненной территории (с. Дитятки), и сопоставимы со значениями, полученными при анализе популяции ласточек с условно чистой территории (с. Жовтневе). При сравнении ласточек из сел Дитятки и Жовтневе статистически значимое повышение уровня наблюдалось только по ХЯ ($0,052 \pm 0,010 \text{ ‰}$ – Дитятки, $0,010 \pm 0,010 \text{ ‰}$ – Жовтневе, $p < 0,05$). Различий по уровню ПЯ не было. Аналогичная закономерность отмечена и при сравнении показателей нарушения митоза (ДЛЯ + ДЭ): достоверно пониженные частоты этого пара-

метра характеризовали популяцию ласточек с. Пески; ласточки сел Жовтневе и Дитятки имели схожие частоты проявлений нарушения митоза (рис. 2). Двухлопастные ядра и двухъядерные эритроциты мы приняли как показатели нарушения митоза, поскольку ДЛЯ отображают амитотическое деление, а ДЭ – нарушение цитокинеза.

Из изложенных результатов становится очевидным, что эритроциты ласточек с максимально загрязненной территории характеризуются пониженными (по сравнению с среднезагрязненной зоной) частотами интерфазных проявлений хромосомной нестабильности и имеют сопоставимые по значению уровни данных показателей с птицами условно чистой зоны (за исключением ДЛЯ + ДЭ, $p < 0,05$).

Обращает на себя внимание тот факт, что в среднезагрязненной зоне (с. Дитятки) наблюдается наивысший уровень маркера радиационного воздействия, а именно «хвостатых» ядер по сравнению с сильно загрязненной зоной. Можно предположить, что данный феномен является результатом практически полной элиминации радиочувствительных особей в максимально загрязненных районах.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о возможном наличии обратной зависимости уровня хромосомной нестабильности у ласточек и частоты летальных мутаций в половой хромосоме дрозофилы от плотности радиоактивного загрязнения. Описанное явление может иметь несколько возможных объяснений:

1) жесткий отбор на загрязненных территориях против особей, имеющих повышенный уровень нестабильности хромосом и летальных мутаций;

2) адаптация организмов, живущих на загрязненных территориях, к хроническим дозам радиоактивного воздействия;

3) миграция особей с повышенным уровнем хромосомной нестабильности в более чистые районы (только для птиц).

Существуют предварительные данные, свидетельствующие в пользу второго и третьего объяснения (Mousseau, Beckham et al., неопубликованные данные). Но при этом необходимо отметить, что наибольшим мутационным грузом характеризуется популяция дрозофил с территории, имеющей наибольшее радиацион-

ное загрязнение. Можно предположить, что повышенная гетерозиготность этой популяции также свидетельствует о ее повышенной адаптивности.

Мы полагаем, что для однозначного ответа на поставленные вопросы необходимы дополнительные исследования других территорий, анализ нескольких поколений птиц и дрозофил, а также исследования определенных птиц в течение нескольких лет.

Авторы выражают благодарность В. Безрукову, В. Тротта, И. Чижевскому, А. Пекло, А. Залисскому, Г. Милиневскому, В. Миленко и сотрудникам биологического факультета Одесского университета за помощь в сборе материала, а также Н.И. Гуце за помощь в постановке эксперимента.

*I.A. Kozeretska, A.V. Protsenko,
S.R. Rushkovskyy, K.S. Afanasieva, A.I. Chuba,
V.F. Bezrukov, T.A. Mousseau, A.P. Moller*

MUTATION PROCESSES IN THE NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA* AND *HIRUNDO RUSTICA* FROM UKRAINIAN RADIATION CONTAMINATED TERRITORIES

Natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Hirundo rustica* that reside at the territories with different levels of radioactive pollution were investigated. The levels of visible mutations, sex-linked mutations and gonad reduction of *Drosophila* and the rate of interphase markers of chromosomal instability in erythrocytes of birds were selected as parameters for population monitoring. The results point out to possible reverse dependence among the level of chromosomal instability of birds, the rate of lethal mutations in sex chromosome of *Drosophila* and the density of radioactive pollution.

*I.A. Козерецька, О.В. Проценко,
С.Р. Рушковський, К.С. Афанасьєва, Г.І. Чуба,
В.Ф. Безруков, Т.А. Мюссе, А.П. Меллер*

МУТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA* ТА *HIRUNDO RUSTICA* З РАДІАЦІЙНО ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЙ УКРАЇНИ

Досліджено природні популяції *Drosophila melanogaster* та *Hirundo rustica* України, які походять із територій з різним рівнем радіоактивного забруднення. Частота видимих мутацій, зчеплених зі статтю мутацій, а також редукція гонад у дрозофіли та частота інтерфазних проявів хромосомної нестабільності в еритроцитах птахів були обрані як параметри для генетичного моніторингу. Отримані результати свідчать про мож-

ливу наявність зворотної залежності між рівнем хромосомної нестабільності у ластівок та частоти летальних мутацій в статевій хромосомі дрозофіли і щільністю радіоактивного забруднення.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chernobyl Forum*. 2005. Chernobyl : The True Scale of the Accident. 20 Years Later a UN Report Provides Definitive Answers and Ways to Repair Lives, IAEA, WHO, UNDP.
2. *Sorochinsky B.* Are there genetic consequences after the Chernobyl accident? // *European Radiation Research*. – Kyiv, 2006. – P. 36.
3. *European Radiation Research* : Abstr. book. – Kyiv, 2006. – 250 p.
4. *Mousseau T.A., Nelson N., Shestopalov V.* Don't underestimate the death rate from Chernobyl // *Nature*. – 2005. – **437** (7062). – P. 1089.
5. *Roberts D.B.* *Drosophila* a practical approach. – Oxford, 1986. – 198 p.
6. *Урбах В.Ю.* Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 296 с.
7. *Afanasyeva K., Rushkovsky S., Bezrukov V.* Parameters of chromosomal instability of *Pygoscelis papua* // *Bulgar. Antarct. Res.* – 2006. – **5**. – P. 9–13.
8. *Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R. et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans // *Mutat. Res.* – 2000. – **463**. – P. 111–172.
9. *Гершензон С.М.* Новые данные по генетике природных популяций *Drosophila fasciata* // Сб. работ по генетике / Ин-т зоологии АН УССР. – Киев, 1941. – № 4/5. – С. 13.
10. *Захаров И.К., Скибицкий Е.Э.* Генетика нестабильных аллелей генов X-хромосомы, выделенных в период вспышки yellow-мутаций 1982–1991 годов в природной популяции *Drosophila melanogaster* Умани // *Генетика*. – 1995. – **31**, № 8. – С. 1079–1084.
11. *Гвоздев В.А.* Подвижная ДНК эукариот // *Соровский бор. журн.* – 1998. – № 8. – С. 8–21.
12. *Захаров И.К.* Вспышки мутаций и транспозоны в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // *Информ. вест. ВОГиС*. – 2001. – № 16. – С. 13–18.
13. *Захаров И.К., Голубовский М.Д.* Возвращение моды на мутацию yellow в природной популяции *Drosophila melanogaster* г. Умани // *Генетика*. – 1985. – **21**, № 8. – С. 1298–1305.
14. *Иванов Ю.Н., Голубовский М.Д.* Повышение мутабельности и появление мутационно-нестабильных аллелей локуса *singed* в популяциях *Drosophila melanogaster* // *Генетика*. – 1977. – **13**, № 4. – С. 655–666.
15. *Голубовский М.Д., Иванов Ю.Н., Захаров И.К., Берг Р.Л.* Исследование синхронных и параллельных изменений генофондов в природных популяциях плодовых мух *Drosophila melanogaster* // *Генетика*. – 1974. – **10**, № 4. – С. 72–83.
16. *Курса М.А., Афанасьева Е.С., Рушковский С.Р. и др.* Цитогенетические параметры нестабильности генома птиц в эколого-генетическом мониторинге // *Проблемы безопасности атомных электростанций та Чернобиля*. – 2005. – Вип. 3, ч. 2. – С. 92–96.

Поступила 13.06.07