

СКОРОБАГАТЬКО Д.А.<sup>1,2✉</sup>, СТРАШНЮК В.Ю.<sup>1</sup>, МАЗИЛОВ А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,  
Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: d\_skorobagatko@bk.ru

<sup>2</sup> ННЦ «Харьковский физико-технический институт»,  
Украина, 61108, г. Харьков, ул. Академическая, 1  
✉ d\_skorobagatko@bk.ru, (067) 300-78-26

## ОСОБЕННОСТИ КОНЬЮГАЦИИ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ В ПОТОМСТВЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. ПОСЛЕ ОСТРОГО $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ

Изучение генетических последствий ионизирующего излучения является одним из актуальных направлений исследований в области генетики и радиобиологии. Риски, связанные с вероятностью генетических повреждений у человека и других живых организмов, в результате ионизирующего излучения возрастают, что связано с увеличением воздействия различных источников радиации. Остро стоят вопросы генетической безопасности и охраны здоровья.

Пространственная организация клеточного ядра в настоящее время рассматривается как фактор эпигенетического контроля генной экспрессии [1]. Важную роль при этом играют гомологичные и негомологичные ассоциации хромосом, оказывающие влияние на взаимное расположение различных элементов генома.

Ранее в исследованиях на дрозофиле были показаны межлинейные различия в частоте нарушений гомологичного спаривания политенных хромосом [2, 3]. Повышение уровня спонтанного асинапсиса наблюдали в связи с гибридизацией при изучении явления гетерозиса [3–5].

Работы, касающиеся влияния внешних факторов на взаимодействие гомологичных хромосом в соматических клетках, встречаются крайне редко [6, 7], данные об эффектах ионизирующего излучения отсутствуют.

Целью работы было изучить особенности гомологичной конъюгации политенных хромосом в слюнных железах личинок в потомстве дрозофилы после острого  $\gamma$ -облучения.

### Материалы и методы

В работе использовали линию дикого типа *Oregon-R Drosophila melanogaster* Meig. из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой питательной среде при температуре  $24,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ . Культуры дрозо-

филы развивались в стаканчиках объемом 60 мл. Объем питательной среды в каждом стаканчике составлял 10 мл.

В работе использовали дозы облучения 8 Гр и 16 Гр. Виргинных самок и самцов имаго дрозофилы в возрасте 3-х суток подвергали облучению на линейном ускорителе электронов ЛУЭ-10. Облучение проводили тормозными  $\gamma$ -квантами, образующимися при взаимодействии электронного пучка с толстой алюминиевой мишенью. Энергия электронов составляла 9,4 МэВ, сила тока – 810 мкА, толщина алюминиевого конвертора – 38 мм. Мощность дозы в точке облучения была рассчитана с помощью детекторов Harwell Red 4034 (Harwell, Великобритания), определяющих поглощенную дозу, и составляла 0,4 Гр/с. Тормозной спектр с учетом геометрии эксперимента рассчитывался с помощью программного пакета GEANT 4. Тормозной спектр представлял собой кривую Бете-Гайтлера, где 97 % энергий  $\gamma$ -квантов приходилось на энергии до 3 МэВ, в том числе 70 % на энергии до 500 кэВ.

Политенные хромосомы исследовали на давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез дрозофилы. Для приготовления препаратов использовали самок в конце 3-й личиночной стадии развития. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа при увеличении  $\times 200$ . Определяли долю ядер с различным числом нарушений гомологичной конъюгации: без нарушений, с 1-м, 2-мя, 3-мя и более асинаптирующими участками хромосом. На основании этих данных рассчитывали среднюю частоту асинапсиса в слюнных железах личинок в контрольном и опытных вариантах. Исследовали по 10 личинок в каждом варианте эксперимента. На каждом препарате исследовали по 30–45 ядер, в среднем по 330–370 ядер в каждом варианте опыта.

Проведен статистический анализ данных. Значимость различий по доле ядер с различным числом асинаптических сегментов оценивали методом  $\chi^2$ . Для оценки значимости влияния градаций фактора на частоту асинапсиса использовался дисперсионный анализ качественных признаков [8].

### Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены данные о процентном распределении ядер с разным количеством асинаптических участков в слюнных железах личинок дрозофилы в поколении  $F_1$  после  $\gamma$ -облучения. После облучения в дозе 8 Гр наблюдали статистически значимые различия с контролем. В данной группе содержание ядер, в которых асинапсис не обнаружен, увеличилось на 13,7 %; доля ядер с одним асинаптическим участком уменьшилась на 42,2 % по сравнению с контрольной группой. При действии облучения в дозе 16 Гр значимых отличий от контроля не выявлено.

На основе данных о распределении ядер с разным числом асинаптических участков определяли общую частоту асинапсиса в слюнных железах личинок дрозофилы в поколении  $F_1$  после  $\gamma$ -облучения. Результаты представлены на рисунке 2.

Согласно полученным данным, в поколении  $F_1$  после дозы облучения 8 Гр частота асинапсиса существенно снизилась: разница по

отношению к контролю составила 41,5 %. После облучения в дозе 16 Гр значимых отличий от контроля не наблюдали.

Таким образом, показано снижение частоты асинапсиса гомологичных хромосом в клетках слюнных желез личинок в потомстве  $F_1$  дрозофилы после острого  $\gamma$ -облучения при дозе 8 Гр и отсутствие эффекта при дозе 16 Гр. Дисперсионный анализ показал с высокой степенью значимости ( $F\varphi = 53,0$ ;  $p < 0,001$ ) влияние градаций фактора на частоту нарушений гомологичной конъюгации в политенных хромосомах дрозофилы.

Архитектоника клеточного ядра отличается видоспецифичностью, имеет тканеспецифический характер и изменяется в онто- и филогенезе [1, 9]. Данные литературы свидетельствуют о том, что принципы мейотической и соматической конъюгации едины [10, 11]. В литературе асинапсис гомологических хромосом объясняется преимущественным притяжением некоторых участков хромосом, локализация которых обычно коррелирует с положением гетерохроматина [2, 12]. Показано также, что зоны нарушения конъюгации начинаются или заканчиваются в центромерном, теломерном и интеркалярном гетерохроматине [12, 13]. Известно, что гетерохроматиновые районы хромосом отличаются высоким полиморфизмом и лабильностью репликации в онтогенезе [14].

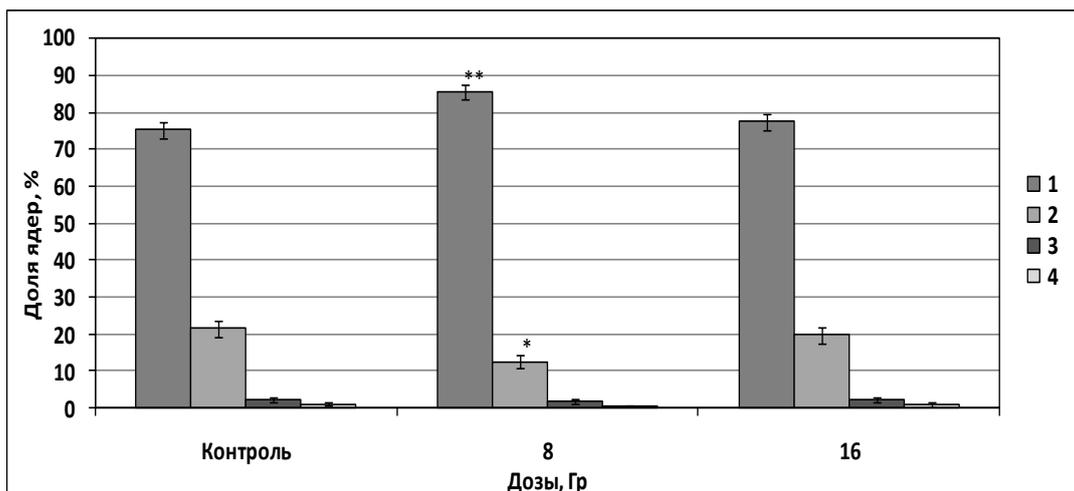


Рис. 1. Распределение ядер с разным числом асинаптических участков в слюнных железах личинок дрозофилы в поколении  $F_1$  после  $\gamma$ -облучения: 1 – асинапсис отсутствует, 2 – одиночный асинапсис, 3 – два асинаптирующих участка; 4 – три и более асинаптических участка. Различия по сравнению с контролем достоверны при \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

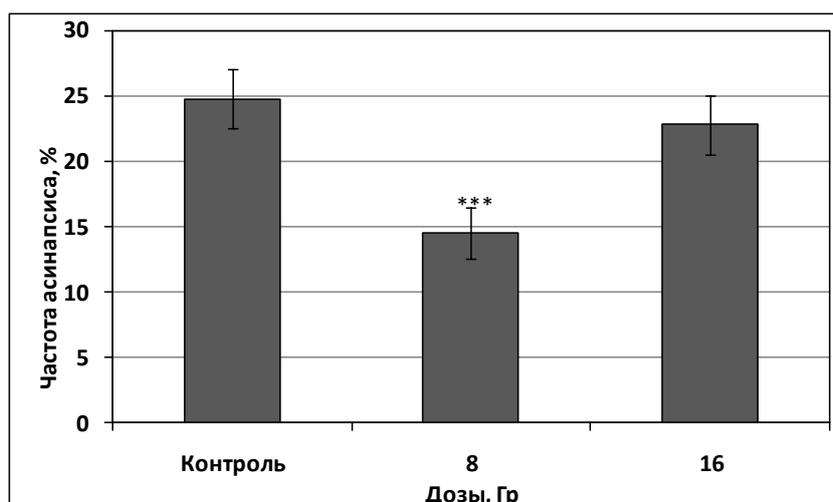


Рис. 2. Частота асинапсиса в слюнных железах личинок дрозофилы в поколении  $F_1$  после  $\gamma$ -облучения. Различия по сравнению с контролем достоверны при \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Различают два типа асинапсиса гомологичных хромосом: специфический и неспецифический, или спонтанный. Первый тип асинапсиса является регулярным и связан с различным рисунком дисков хромосом, что имеет место, например, при межвидовой гибридизации [15, 16]. Второй тип происходит при идентичной картине последовательности дисков, его природа до конца не изучена [13, 16]. М. Эшбернер указывает на влияние наличия или отсутствия физического контакта гомологичных хромосом на экспрессию генов. В условиях синапсиса, по его мнению, возможна коррекция повреждений, что приводит к восстановлению генной активности, и отражается на морфологии пуфов [17]. Подобные цис-транс-взаимодействия, которые могут сопровождаться как активацией, так и инактивацией генов, получили название трансвекции [18, 19].

Эффект, производимый  $\gamma$ -излучением на взаимодействие гомологичных хромосом, может быть объяснен с учетом данных об их влиянии на структуру хроматина. На разных объектах – на клетках животных и человека – было показано, что различные виды ионизирующего излучения способны индуцировать структурные изменения в хроматине.

В работе [20] наблюдали деконденсацию хроматина в гепатоцитах крыс после рентгеновского облучения, максимальный эффект имел место при дозах от 4 до 6 Гр. Подобный эффект был обнаружен также при облучении клеток HeLa в тех же дозах. В лимфоцитах периферической крови плато обнаружено после дозы 1

Гр. Немедленную и дозозависимую релаксацию хроматина наблюдали в человеческих лимфоцитах периферической крови в фазе G0 при облучении гамма-квантами в дозах 1–5 Гр [21].

В работе [22] на опухолевые фибробласты джунгарского хомячка действовали гамма-излучением в дозах до 20 Гр. Потомки облученных клеток были в три раза более радиорезистентнее родительских, а уровень компактизации хроматина у них был в 1,4 раза выше. При дозе 5 Гр наблюдали релаксацию петель хроматина в родительских клетках. Таким образом, при разных дозах облучения возможны различные эффекты.

По данным работы [23] при облучении клеток буккального эпителия человека нейтронами содержание гетерохроматиновых гранул может как увеличиваться, так и снижаться, в зависимости от длительности облучения.

Согласно Ayoub et al. [24], ответ клетки на повреждение ДНК начинается с изменений состояния хроматина путем модификации медиаторов хроматинового компактизирующего белка HP1, но не самого кода ДНК. По данным, приведенным в обзоре [25], белки, распознающие повреждения ДНК, соединяются с участками двойных разрывов ДНК в течение нескольких минут после воздействия ионизирующего излучения, что приводит к образованию микроскопически видимых ядерных областей, называемых радиационно-индуцированными фокусами (РИФ). Некоторые РИФ наблюдаются спустя дни после облучения и являются знаками постоянной перестройки хроматина.

Данные об изменениях состояния компактизации хроматина при действии ионизирующего излучения могут быть применимы для объяснения возможных механизмов влияния радиации на взаимодействие гомологичных хромосом, обнаруженного в нашем исследовании. При этом надо учитывать, что гетерохроматиновые районы являются сайтами инициации синапсиса. Зависимость частоты асинапсиса от количества гетерохроматина была показана ранее Е.С. Беляевой [26] при использовании инверсии *scute*.

## Выводы

В потомстве  $F_1$  *Drosophila melanogaster* после острого  $\gamma$ -облучения при дозе 8 Гр наблюдали снижение частоты асинапсиса гомологичных хромосом в клетках слюнных желез личинок на 41,5 %. При дозе 16 Гр эффект отсутствовал. Дисперсионный анализ показал с высокой степенью значимости ( $F\phi = 53$ ,  $p < 0,001$ ) влияние градаций фактора на частоту нарушений гомологичной конъюгации в политенных хромосомах дрозофилы после  $\gamma$ -облучения. Полученные результаты свидетельствуют о возможном влиянии  $\gamma$ -излучения на транс-взаимодействия локусов гомологичных хромосом вследствие изменения частоты асинапсиса.

## Литература

1. Стегний В.Н. Эволюционное значение архитектоники хромосом как формы эпигенетического контроля онто- и филогенеза эукариот // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1215–1224.
2. Полянская Г.Г. Сравнительное изучение асинапсиса политенных хромосом слюнных желез в разных линиях *Drosophila melanogaster* // Вестник ЛГУ. – 1975. – № 3. – С. 122–131.
3. Лапта Г.Е., Шахбазов В.Г. Нарушение конъюгации политенных хромосом у инбредных линий и межлинейных гибридов *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1976. – Т. 12, № 2. – С. 121–125.
4. Шакина Л.А., Страшнюк В.Ю., Шахбазов В.Г. Особенности гомологичного и негомологичного спаривания политенных хромосом у инбредных линий и гибридов дрозофилы // Вісник Харк. нац. ун-ту. Серія: біологія. – 2005. – Вип. 1–2. – С. 105–110.
5. Таглина О.В. Изучение спонтанного асинапсиса политенных хромосом слюнных желез *Drosophila melanogaster* у высокоинбредных линий, комбинированных линий и их гибридов // Вісник Харківського нац. ун-ту: Серія біологія. – 2006. – № 729, вип. 3. – С. 136–140.
6. Вассерлауф И.Э., Шелковникова Т.А., Митренина Е.Ю., Стегний В.Н. Нарушения спаривания гомологичных хромосом в ядрах трофоцитов яичников *Drosophila melanogaster* при инбридинге и низкой температуре // Цитология. – 2005. – Т. 47, № 9. – С. 798–799.
7. Навроцкая В.В., Шахбазов В.Г., Коробов В.А. Спонтанный асинапсис политенных хромосом слюнных желез дрозофилы при действии красного света на родительское поколение // Материалы XXIV Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии». – Ялта, 2005. – С. 136–137.
8. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии: учебник для студ. высш. уч. зав. – Горловка: «Видавництво Ліхтар», 2008. – 248 с.
9. Стегний В.Н., Артемов Г.Н., Ананьина Т.В., Коханенко А.А., Усов К.Е. Пространственная организация и динамика хромосом (онто- и филогенетический аспекты) // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 9. – С. 707–708.
10. Евгеньев М.Б. Конъюгация политенных хромосом и кроссинговер в межвидовых гибридах *Drosophila* // Генетика. – 1970. – Т. 6, № 1. – С. 96.
11. Лапта Г.Е. Нарушение конъюгации гомологов политенных хромосом у гомо- и гетерозиготных организмов: автореф. автореф. дис. на соискан. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». – М., 1980. – 16 с.
12. Prokofyeva-Belgovskaya A.A. Heterochromatinization as a change of chromosome cycle // J. Genet. – 1947. – V. 48. – P. 80–98.
13. Лапта Г.Е. Локализация асинаптенных сегментов в 2R- и 3L-хромосомах при нарушении конъюгации политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1977. – Т. 13, № 6. – С. 1064–1072.
14. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. – М.: Наука, 1986. – 432 с.
15. Dobzhansky T., Tan C. Comparison on the gene arrangements in two species of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila miranda* // Z. Indukt. Abatammungs und Vererbungslehre. – 1936. – No 72. – P. 88–104.
16. Evgen'ev M.B., Polianskaya G.G. The pattern of polytene chromosome synapsis in *Drosophila* species and interspecific hybrids // Chromosoma. – 1976. – V. 57. – P. 285–295.
17. Ashburner M. The genetic analysis of puffing in polytene chromosomes of *Drosophila* // Proc. Roy. Soc. Lond. – 1970. – V. B176. – P. 319–327.
18. Duncan I.W. Transvection effects in *Drosophila* // Annu. Rev. Genet. – 2002. – V. 36. – P. 521–526.
19. Kennison J.A., Southworth J.W. Transvection in *Drosophila* // Adv. Genet. – 2002. – V. 46. – P. 399–420.
20. Ихтиар А. Влияние ионизирующего излучения с различной ЛПЭ на состояние хроматина в клетках млекопитающих и его взаимосвязь с индукцией и репарацией хромосомных повреждений: автореф. дис. на соискан. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.01 «Радиобиология». – Санкт-Петербург, 1993. – 26 с.

21. Belyaev I.Y., Czene S., Harms-Ringdahl M. Changes in chromatin conformation during radiation-induced apoptosis in human lymphocytes // *Radiat. Res.* – 2001. – V. 156. – P. 355–364.
22. Алипов Е.Д., Тырсия Е.Г., Саримов р.М., Рузов А.С., Прохорчук Е.Б. Приобретенная радиорезистентность потомков облученных клеток сопровождается перестройками в организации хроматина // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2004. – Т. 44, № 2. – С. 188–197.
23. Кузнецов К.А., Бережной А.Ю., Кизим П.С., Онищенко Г.М., Шкорбатов Ю.Г. Клеточные эффекты воздействия нейтронного излучения // *Актуальные вопросы биологической физики и химии.* – 2016. – № 1. – С. 87–90.
24. Ayoub N., Jeyasekharan A.D., Bernal J.A., Venkitaraman A.R. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response // *Nature.* – 2008. – V. 453 (7195). – P. 682–686. doi: 10.1038/nature06875.
25. Costes S.V., Chiolo I., Pluth J.M., Barcellos-Hoff M.H., Jakob B. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage loci and their relation to chromatin organization // *Mutation Research.* – 2010. – V. 704. – P. 78–87. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.12.006.
26. Belyaeva E.S. Asynapsis of homologues in *Drosophila melanogaster* salivary chromosomes // *Drosophila Information Service.* – 1973. – V. 50. – P. 40.

**SKOROBAGATKO D.A.<sup>1,2</sup>, STRASHNYUK V.Yu.<sup>1</sup>, MAZILOV A.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> V.N. Karazin National University of Kharkiv,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq., 4, e-mail: d\_skorobagatko@bk.ru

<sup>2</sup> NSC "Kharkiv Institute of Physics and Technology",

Ukraine, 61108, Kharkiv, Academic str., 1

#### **PECULIARITIES OF CONJUGATION OF POLYTENE CHROMOSOMES IN THE OFFSPRING OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. AFTER EXPOSURE TO THE ACUTE $\gamma$ -IRRADIATION**

**Aim.** The purpose of investigation was to study the peculiarities of homologous conjugation of polytene chromosomes in the salivary glands of larvae in *Drosophila melanogaster* offspring after exposure to acute  $\gamma$ -irradiation. **Methods.** Experiments were carried out on wild type *Oregon-R* strain. Three-day-old flies were irradiated by brake gamma rays on the linear electron accelerator LEA-10. The dose rate was 0.4 Gr/sec. The effects of acute  $\gamma$ -radiation at doses of 8 Gr and 16 Gr were studied. Giant chromosomes were investigated in squashed preparations of the salivary glands stained by acetoorcein. Preparations were obtained from the females at the end of third larva stage. **Results.** The decrease at 41.5 % in asynapsis frequency of homologous chromosomes in salivary gland cells of larvae in *Drosophila F<sub>1</sub>* progeny after  $\gamma$ -irradiation at the dose of 8 Gr was shown. No effect was observed at the dose of 16 Gr. Analysis of variance showed with a high degree of significance ( $F\varphi = 53, p < 0,001$ ) the influence of gradations of factor on the frequency of violations of conjugation of homologous in *Drosophila* polytene chromosomes. **Conclusions.** The results suggest a possible effect of gamma-radiation on the trans-interaction of loci of homologous chromosomes due to the changes in the asynapsis frequency.

**Keywords:** giant chromosomes, spontaneous asynapsis, trans-interactions, ionizing radiation.