

## ЛИТЕРАТУРА

1. ICRP Publication 108. Environmental Protection: the Concept and Use of Reference Animals and Plants. Annals of the ICRP, 2008. – 251 p.
2. Гудков И.Н., Кудяшева А.Г., Москалёв А.А. Радиобиология с основами радиоэкологии : учебное пособие / И.Н. Гудков, А.Г. Кудяшева, А.А. Москалёв. – Сыктывкар : Изд-во СыктГУ, 2015. – 512 с.
3. Гудков Д.И., Дзюбенко Е.В., Пинкина Т.В., Шевцова Н.Л., Чепига Л.С., Назаров А.Б. Эффекты хронического и острого радиационного воздействия у пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* L. Радиоэкология XXI века: материалы Международной научно-практической конференции, Красноярск, 14–16 мая 2012 года. – Красноярск: СФУ, 2012. – с. 246–253
4. Гребенников М.Е., Хохуткин И.М. Содержание тяжелых металлов в наземных моллюсках в районе Среднеуральского медеплавильного завода: материалы научно-практической конференции «Экологические основы стабильного развития Прикамья». Пермь, 2000. – С. 43.
5. Платонов А.Г. Применение метода пробит-анализа в радиобиологии. Расчет популяционной дозы ЛД50: Учебно-методическое пособие / А.Г. Платонов, М.Я. Ахалая. – М.: НИЯУ МИФИ, –2010. – С. 36

## ГЕНОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ПОТОМКОВ САМЦОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ОБЛУЧЕННЫХ $\gamma$ -КВАНТАМИ $\text{Co}^{60}$ GENOMIC CHANGES IN THE PROGENY OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* MALES IRRADIATED BY $\gamma$ -RAYS

**К. П. Афанасьева<sup>1</sup>, А. Н. Русакович<sup>1</sup>,  
Н. Е. Харченко<sup>1</sup>, И. Д. Александров<sup>1</sup>, М. В. Александрова<sup>1</sup>  
K. P. Afanasyeva<sup>1</sup>, A. N. Rusakovich<sup>1</sup>,  
N. E. Kharchenko<sup>1</sup>, I. D. Aleksandrov<sup>1</sup>, M. V. Aleksandrova<sup>1</sup>**

Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия  
afanasyeva@jinr.ru

Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

Представлены результаты секвенирования и биоинформационного анализа геномных изменений у 9 F1 потомков самцов изогенной линии *D. melanogaster*, облученных  $\gamma$ -квантами  $\text{Co}^{60}$  в дозе 40 Гр ( $\text{LD}_{85}$ ) и 3 контрольных образцов. У 9 потомков от облученных самцов обнаружено всего 47 геномных изменений (32 достоверных и 15 мозаичных *de novo* мутаций), что равно частоте 5,2 мутации/геном. Спектр изменений включал 33 делеции размером 17–78000 п.н., 4 дупликации размером 322–1371 п.н., 4 реципрокные транслокации и 6 инверсий в X, 2 и 3 хромосомах. В 3 изученных контрольных образцах было обнаружено 2 делеции размером 98 и 128 п.н. в 3 хромосоме (частота – 0,66 мутаций/геном). Это показывает, что у потомков облученных самцов частота *de novo* мутаций на уровне генома в 7,9 раз выше, чем в контроле, даже без учета замен оснований и инделов, анализ которых продолжается. Почти половина выявленных структурных изменений генома затрагивают кодирующие гены. Таким образом, полученные результаты показывают, что геномное секвенирование нового поколения позволяет выявлять гораздо более широкий спектр мутаций любой величины. Это свидетельствует о гораздо более высокой генетической опасности редкоизирующей радиации, чем это предполагалось ранее.

The results of sequencing and bioinformatics analysis of genomic changes in 9 F1 progeny of males from the isogenic line *D. melanogaster* irradiated by  $\text{Co}^{60}$   $\gamma$ -rays at a dose of 40 Gy ( $\text{LD}_{85}$ ) and in 3 control samples are presented. In 9 progeny from irradiated males, a total of 46 genomic changes (32 significant and 15 mosaic *de novo* mutations) were found, which is equal to a frequency of 5.2 mutations/genome. The spectrum of changes included 33 deletions (17–78 000 bp in size), 4 duplications (322–1371 bp), 4 reciprocal translocations and 6 inversions in X, 2 and 3 chromosomes. In 3 studied control samples, 2 deletions (98 and 128 bp in length) were found in 3 chromosome (frequency – 0.66 mutations/genome). This shows that in the progeny of irradiated males, the frequency of *de novo* mutations at the genome level is 7.9 times higher than in the control, even without taking into account base substitutions and indels, the analysis of which is ongoing. Almost half of the identified structural changes in the genome affect coding genes. Thus, the results show that next-generation genome sequencing can detect a much wider range of mutations of any size. This indicates a much higher genetic hazard of sparsely ionizing radiation than previously thought.

**Ключевые слова:** геномное секвенирование нового поколения,  $\gamma$ -излучение, сперматозоид, F1 поколение, геномные мутации, *Drosophila*.

Возможность предсказать генетические последствия у потомков облученных родителей остается одной из актуальных проблем радиационной генетики. Результаты работ классической радиационной генетики на *Drosophila* [1-3] и мыши [4, 5] позволили получить первое представление о спектре и частоте наследуемых *de novo* мутаций отдельных генов и впервые оценить генетическую опасность редкоизирующих излучений по индукции таких мутаций [6]. Наблюдаемый прогресс в ДНК- и ИТ-технологиях впервые открывает возможность изучить генетические последствия у потомков облученных родителей на уровне всего генома. Исследования в области радиационной геномики только начинаются и уже первые работы, выполненные на мышах, показали, что редкоизирующее излучение при LD<sub>50</sub> в несколько раз повышает частоту наследуемых структурных изменений генома типа делеций и дупликаций (copy number variation - CNV), небольших, до 50 пар нуклеотидов, инсерций/делеций (indels) [7]. Поскольку, данные, полученные в системе *Drosophila*-мышь, являются определяющими для экстраполяции на человека, нами начаты широкомасштабные радиационно-геномные исследования на *Drosophila melanogaster*, с целью изучить спектр и частоту наследуемых изменений ДНК генома этого организма.

Для исключения возможного генетического полиморфизма в исходной лабораторной дикой линии D-18 *Drosophila melanogaster*, была сконструирована изогенная линия в процессе ряда последовательных генетических скрещиваний исходного самца с набором линий с инверсиями во всех крупных хромосомах дрозофилы (X, 2, и 3). Таким образом самки и самцы этой линии являются максимально изогенными по всей геномной ДНК (171,4 Мб) [8]. В контрольных и радиационных экспериментах 3-4 дневный самец изогенной линии D-18 (Изо 9.1) скрещивался с 5 самками той же линии в течение суток. Самцы облучались  $\gamma$ -квантами Co<sub>60</sub> на установке Рокус-М в дозе 40 Гр, (LD<sub>85</sub>), что соответствовало наиболее высокой частоте локус-специфических мутаций [9]. Геномную ДНК самок F<sub>1</sub> выделяли с помощью безфенольного метода, адаптированного к выделению из индивидуальных особей. Предподготовку библиотек для геномного секвенирования и само секвенирование на платформе Illumina проводили на базе ООО «Новые Молекулярные Технологии», г. Москва. Биоинформационный анализ результатов секвенирования проводили на базе Лаборатории клинической биоинформатики, г. Москва. В процессе биоинформационного анализа картирование прочтений проведено с помощью bwa mem v.0.7.12-r1039 на референсный геном r6.28 (dmel-all-chromosome-r6.28.fasta.gz). Постобработка выравнивания и маркирование возможных ПЦР-дубликатов проведено с помощью samtools v.1.12. Анализ покрытия проведен с помощью mosdepth v.0.1.9 с вычетом перехлестов парных прочтений. На данном этапе исследования проведен только коллинг CNV и структурных изменений генома типа инверсий и транслокаций (structural variation –SV) с помощью delly v.0.8.7 согласно рекомендациям разработчиков. Ручная проверка вариантов осуществлена в IGV 2.7.2 путем сравнения локального распределения прочтений в интересующем участке между исследуемым образцом и контрольными.

В результате поиска выявлен ряд достоверных мутаций *de novo* в опытных образцах, а также в контрольных, и отдельная группа мозаичных мутаций со сложными для сборки участками (табл.1).

Учитывая изогенность генотипа самок и самцов, *de novo* мутации, индуцированные в зрелых спермиях самцов, должны наблюдаться как гетерозиготы у самок F<sub>1</sub>. Поэтому за достоверные мутации принимались те случаи, где в 50% ридов наблюдалось идентичное изменение. Случаи, когда идентичное мутационное изменение наблюдалось только у 20-25% ридов, а остальные риды этого участка показывали трудно идентифицируемую картину, были определены как мозаицизм или участки, сложные для сборки.

Геномный анализ у 9 самок F<sub>1</sub> от облученных самцов выявил в целом, 47 мутаций *de novo*, что дает частоту 47/9=5,22 мутаций/геном, тогда как в контроле выявлено всего 2 мутации (делеции) на 3 изученных генома (частота 2/3=0,66). Отсюда следует, что гамма-кванты почти в 8 раз увеличивают частоту *de novo* мутаций у потомков облученных самцов по сравнению с контролем (5,22/0,66=7,9). Среди 47 идентифицированных мутаций достоверными являлись 32, из которых 23 были делециями, 4 –дупликациями, 4- транслокациями (Т) и 1 была инверсией (In). Остальные 15 являлись мозаичными делециями (10) или инверсиями (5), локализованными в сложных для сборки участках.

Анализ представленных в таблице данных показывает, что среди достоверных мутаций делеции возникают наиболее часто, чем другие мутации, индуцированные в геноме зрелых спермиев облученных самцов. Их частота составляет 23 делеции / 9 геномов = 2,55 делеций/геном. Учитывая их частоту в контроле, можно сказать, что  $\gamma$ -кванты Co<sub>60</sub> в дозе 40 Гр увеличивают частоту делеций почти в 4 раза. Частота остальных структурных мутаций существенно ниже и составляет для реципрокных транслокаций 4/9=0,44 Т/геном, для дупликаций - 4/9=0,44 Др/геном и для инверсий - 1/9=0,11 In/геном.

Детальный анализ размера и положения делеций показывает, что делеции локализуются во всех крупных хромосомах генома дрозофилы и их размеры варьируют от 17 до 541 п.н, и только в одном случае ее величина составила 71460 п.н. Важно подчеркнуть, что в этом случае было потеряно не менее 9 смежных генов. В случае 13 делеций они затрагивают тот или иной уникальный ген, а остальные 9 делеций локализуются в геномной ДНК вне генов.

Анализ концов делеций показал, что у 7 из 23 - делеция образуется между двумя прямыми повторами, причем, один из повторов делетируется вместе с остальной последовательностью. Это позволяет полагать что триггером для них является индукция двунитевого разрыва ДНК между прямыми повторами с последующей репарацией по механизму SSA [10]. Пример такого механизма отражен на рисунке 1.

AGTTTGTGgaaatatgtttactacccatttcactGACAAATTCTG



AGTTTGTGGACAAATTCTG

Рисунок 1 – Пример образования делеции при индукции двунитевого разрыва между прямыми повторами GA у потомка F1 №2

Размеры 4 идентифицированных дупликаций варьируют от 324 до 1372 п.н., одна из которых расположена в половой хромосоме X, а 3 – в аутосоме 3R. Важно отметить, что 3 из 4 названных дупликаций являются удвоением определенных участков того или иного гена и лишь одна из них в 3R (геном № 12) локализуется вне гена (Табл. 1).

Таблица 1 – Спонтанные и γ-индуцированные геномные мутации у F<sub>1</sub> самок *D. melanogaster*

№ F1 генома	Природа <i>de novo</i> геномных мутаций, их размер (п.н.), хромосомное и молекулярное положение				Мозаики (или сложные для сборки участки)
	Делеции (del)	Дупликации (dp)	Инверсии (In)	Транслокации (T)	
2	2L: (27)* 32912800** (27) 3384773 (39) 3385180 (38) 3943845 (32) 4008318 (33) 4037846 (53) 12134193	0	X: 15428778; 15507858	0	0
3	3L: (143) 7435476 X: (218) 19034341	0	0	T (2; 3): 6630978;13555800	0
4	0	X: (322) 12541159	0	0	0
6	2L: (71460) 302994 (45) 17331761 3R: (66) 23613433	3R: (1371) 18483689 (673) 24541506	0	T (2R; 3R): 11158416;24757527	del в 3L: (1316) 15597982 (1298) 15598536 del в 3R: (98) 27509575
10	2L: (78) 296629	0	0	0	0
12	2R: (541) 19069779 3L: (33) 5333407 3R: (476) 14537558	3R: (454) 24479143	0	T (2R; 3R): 12257854 29430588	0
13	3L: (104) 7204686 (34) 7204767 (333) 8844066 3R: (113) 20755049 (35) 20755057 2R: (1729) 10101013	0	0	0	In в 2R: 1728330; 1728688 In в 3L: 24745793; 24746247 In в 3R: 1455277; 1456100 3023892; 3024519 In в X: 23022336; 23023004
17	0	0	0	0	del в 3L: (28) 5786664
18	2R: (64) 15160954 3R: (17) 16135110	0	0	0	del в 2L: (2280) 2083017 (340) 2084946 (32) 23221619 del в 3R: (28) 5167669 (69) 30607101 del в X: (35) 6145917
K1	3L: (128) 10887916	0	0	0	0
K5	3R: (98) 17007600	0	0	0	0
K6	0	0	0	0	0

Примечание: \* – В скобках указан размер, \*\* – 5' – начало структурных мутаций.

Мозаичные мутации наблюдались только в 4 геномах. Их распределение по хромосомам случайно, хотя обращает на себя внимание тот факт, что все инверсии локализованы в геноме №13.

Завершая первый этап биоинформационного анализа, важно отметить, что фенотипически нормальные потомки облученных самцов в скрытом виде имеют множественные мутационные изменения типа делеций, транслокаций, дупликаций или инверсий, которое могут затрагивать в одном геноме сразу несколько кодирующих генов. Как отмечалось выше,  $\gamma$ -излучение в изученной дозе почти в 8 раз повышает частоту де ново мутаций в геноме F1 потомков облученных самцов и составляет 7,9. Это свидетельствует о том, что существующие представления о генетической опасности ионизирующего излучения, основанные на классических работах по анализу частоты мутаций отдельных генов [6], могут быть существенно занижены. Этот предварительный вывод требует дальнейшего исследования, как с редкоионизирующими, так и плотноионизирующими видами излучений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alexander M.L. Mutation rates at specific autosomal loci in the mature and immature germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1954, 39: 409-428.
2. Muller H.J. Advances in radiation mutagenesis through studies on *Drosophila*. In Bugher JC (ed): "Progress in Nuclear Energy Series VI" New York: Pergamon Press, 1959 pp 146-160.
3. I.D. Alexandrov, M.V. Alexandrova, K.P. Afanasyeva The Nature of Radiation-induced Inherited Recessive Gene Mutations in *Drosophila Melanogaster* *Archives of Molecular Biology and Genetics* 2022;1(1):12-19
4. Searle, A.G. Mutation induction in mice *Adv. Radiat. Biol* 1974, 4, 131-207
5. Russel W.L., Kelly E.M. Mutation frequencies in men *Proc. Natl Acad. Sci USQ* 1982 79, 525-544
6. J.V. Neel, Reappraisal of Studies Concerning the Genetic effects of the radiation of humans, mice and *Drosophila*. / *Environmental and molecular mutagenesis* 1998, 31:4-10
7. A.B. Adewoye, S.J.Lindsay at all The genom-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline / *Nature communication*, 2015, 10.1038
8. R.A. Hoskins, C.D. Smith et al Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly / *Genome Biology* 2002, 3(12) 0085.1-0085.16
9. Л. Н. Давкова, И. Д. Александров, М. В. Александрова Радиационная биология структурно разных генов *Drosophila melanogaster*. Сообщение 5. ген cinnabar: общая и молекулярная характеристика его радиомутабельности / *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2014, том 54, № 1, с. 1–16
10. A.T. Do, at all Double-Strand Break Repair Assays Determine Pathway Choice and Structure of Gene Conversion Event in *Drosophila melanogaster*. / *Genes. Genomes. Genetics*. V.4 2014 425-431.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ ДОЗОВЫХ НАГРУЗОК НА ЩИТОВИДНУЮ ЖЕЛЕЗУ ПРИ АВАРИИ НА БЕЛОРУССКОЙ АЭС MODELING OF DOSE LOADS ON THE THYROID GLAND IN THE EVENT OF AN ACCIDENT AT THE BELARUSIAN NUCLEAR POWER PLANT

**А. Е. Койпиш<sup>1,2</sup>, Е. П. Живицкая<sup>1,2</sup>**

**A. E. Koipish<sup>1,2</sup>, E. P. Zhyvitskaya<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

kaf\_immunal@iseu.by, alinakopish1111@gmail.com

<sup>1</sup>Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU  
Minsk, Republic of Belarus

Представлены результаты прогнозной оценки дозовых нагрузок на щитовидную железу при аварии на Белорусской АЭС. Для моделирования переноса радионуклидов в атмосфере и прогноза радиоактивных выпадений при тяжелой аварии на БелАЭС были рассмотрены 4 сценария метеоусловий: 2 летних, 2 зимних, с разными категориями устойчивости атмосферы. Установлено, что на территории в радиусе 3 км вокруг БелАЭС при запроектной аварии (сценарии 1-4) суммарная потенциальная доза облучения щитовидной железы будет варьироваться в пределах  $4,83\text{E}+03$ - $6,81\text{E}+03$  мЗв. Различия показателей суммарной потенциальной дозы облучения щитовидной железы обусловлены погодными условиями. Наибольшее прогнозируемое значения представлено в зимнем сценарии 3. Результаты показывают необходимость проведения йодной профилактики у населения на расстоянии до 3 км от БелАЭС.