

Изобретение относится к радиобиологии, а точнее к радиоэкологии и предназначено для получения оценки относительного вклада радиоактивного и химического загрязнения в поражение природных популяций гидробионтов.

Анализ распределения повреждений (аббераций) хромосом по клеткам дает существенную информацию о характере взаимодействия мутагенов окружающей среды с наследственными структурами - хромосомами. Точка "приложения" мутагенного воздействия на микроструктуры клетки (хромосомы) на несколько порядков меньше размера ядра клетки, в котором находятся хромосомы. Поэтому действие любых мутагенов на клетку носит случайный характер, основанный на принципе попадания. Вследствие этого исходно распределение первичных повреждений по клеткам должно соответствовать закону Пуассона. Это правило выполняется тогда, когда нет избирательности во взаимодействии мутагена с различными участками ядра. Такая избирательность может наблюдаться при действии химических мутагенов.

Известно (Ли Д.Е. Действие радиации на живые клетки. - М.: Госатомиздат, 1963. - 288с.), что при действии редкоионизирующего внешнего излучения (γ -квантов и рентгеновских лучей) первичные повреждения хромосом распределяются по клеткам случайно, в соответствии с законом Пуассона.

Известно (Бочков Н.П., Яковенко К.И., Чеботарев А.И. и др. // Генетика. - 1972. - Т.8. - №12. - С.160 - 168), что распределение повреждений хромосом лимфоцитов периферической крови человека при действии противоопухолевых препаратов соответствует или геометрическому или отрицательному биномиальному распределению.

Неизвестно, распространяется ли эта закономерность на другие живые организмы и другие типы химических мутагенов.

Неизвестны закономерности подклеточного распределения аббераций хромосом при сочетанном действии радиационного и химического факторов.

Не существует способа определения вклада радиационного и химического воздействия в поражение популяций живых организмов.

В основу изобретения способа цитогенетической идентификации действия радиационного и химического факторов и оценки их относительного вклада в поражение природных популяций гидробионтов, поставлена задача путем установления характера распределения аббераций хромосом по клеткам гидробионтов обеспечить идентификацию цитогенетического действия ионизирующей радиации и химических мутагенов и оценить их относительную эффективность в отношении повреждения.

Поставленная задача достигается тем, что в указанном способе проводят анализ поклеточного распределения аббераций хромосом и устанавливают его соответствие распределению Пуассона или геометрическому, при этом действии β и γ -ионизирующего излучения, а также при его сочетанном с химическими мутагенами действии в случае большей эффективности излучения,

распределение больше соответствует пуассоновскому, а при соизмеримой эффективности обоих факторов и при действии только химических мутагенов распределение аббераций хромосом по клеткам адекватнее геометрическому.

Указанные закономерности были доказаны экспериментально.

В опытах по индуцированию радиационного и химического мутагенеза объектом исследования служили развивающиеся эмбрионы черноморских ракообразных *Gammarus olivii* и *Idotea baltica* из разных популяций в разные сезоны и рыб *Scorpaena porcus* и *Scophthalmus maeticus*. В вариантах с внешним облучением эмбрионы (у ракообразных - в марсупиальных сумках самок) облучали на установке "Исследователь" ^{137}Cs , мощность дозы $0,048\text{Гр}\cdot\text{с}^{-1}$ в дозах 2 - 6Гр. Через сутки материал фиксировали. В ряде опытов эмбрионы инкубировали в течение суток в морской воде, содержащей один из радионуклидов в течение суток в морской воде, содержащей один из радионуклидов - ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{90}Y (в форме соляно- или азотнокислой среды) и ^{14}C (натрий двууглекислый) - в диапазоне концентраций от $74\text{кБк}\cdot\text{л}^{-1}$ до $22\text{МБк}\cdot\text{л}^{-1}$ или химические мутагены - ДДТ, хлорфен, ацетат свинца - в концентрациях $0,1 - 1\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$. В экспериментах по изучению сочетанного действия ионизирующего излучения и химического мутагена, в первом варианте инкубировали эмбрионы *G.olivii* в течение суток в воде, содержащей $^{137}\text{Cs}/11\text{МБк}\cdot\text{л}^{-1}$ и ацетат свинца ($1\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$). Во-втором варианте гидробионты подвергали острому внешнему облучению в дозе 3Гр, а затем на 1 сутки помещали в воду с ацетатом свинца в той же концентрации. Материал фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты, окрашивали 1% ацетоорсеином и готовили давленные препараты. Анализ аббераций хромосом проводили на стадии анафазы - телофазы. В каждом варианте опыта исследовали по 20 - 30 эмбрионов. Учитывали следующие типы аббераций хромосом: одиночный фрагмент, парный фрагмент, одиночный мост, одиночный мост с фрагментом, одиночный мост с парой фрагментов, парный мост, парный мост с фрагментом, парный мост с парой фрагментов. При исследовании экспериментального мутагенеза проанализировали 35423 клетки. Эмпирические распределения сравнивали с ожидаемыми частотами, исходя из двух распределений: Пуассона (1) и геометрического (2):

$$P(n) = \frac{m^n}{n!} e^{-m}. \quad (1)$$

$$P = (1-p)^n p^n \quad (2),$$

где m - среднее число аббераций хромосом на клетку;

n - число аббераций хромосом в клетке;

$$p = \frac{m}{m+1} \text{ - доля абберантных клеток.}$$

Экспериментальные данные о поклеточном распределении аббераций хромосом представлены в табл.1. Из таблицы видно, что у всех исследованных видов гидробионтов при действии на них как внешнего так и инкорпорированного излучения при разном среднем числе аббераций хромосом на клетку

наблюдается хорошее соответствие пуассоновскому распределению. Напротив, при действии таких широко распространенных в водной среде химических мутагенов, как ДДТ, полихлорбифенилы (хлорфен), соли тяжелых металлов (свинец), эмпирические распределения больше соответствуют геометрическому.

При сочетанном действии радиации и химического мутагена (ацетат свинца) (табл.2) оказывается, что характер поклеточного распределения зависит от относительной эффективности взаимодействующих факторов. Из табл.2 видно, что когда эффекты, индуцируемые каждым мутагенным фактором в отдельности соизмеримы, поклеточное распределение aberrаций хромосом при сочетанном действии этих факторов больше соответствует геометрическому. При большей цитогенетической эффективности радиации распределение aberrаций хромосом при комплексном действии облучения и химического мутагена ближе к пуассоновскому.

Таким образом, на основании экспериментальных данных можно заключить, что пуассоновский характер распределения aberrаций хромосом наблюдается при действии на гидробионты ионизирующего излучения, а также при его сочетанном действии с химическими мутагенами в случае большей эффективности первого. При соизмеримой эффективности обоих факторов и при действии только химического мутагена распределение aberrаций больше соответствует геометрическому.

Пример 1. Исследовали распределение aberrаций хромосом в клетках гидробионтов разных таксонов из природных популяций, обитающих в биотопах с различным уровнем загрязнения. Aberrации хромосом исследовали в клетках эмбрионов (ракообразные и рыбы), моллюды (парусник *Velella velella* и моллюски), в соматических клетках паратомически делящихся олигохет, в развивающихся половых клетках (офиуры). Материал фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1), окрашивали 1% ацетоорсеином и готовили давленные препараты. Aberrации хромосом канализировали на стадии анафазы-телофазы. В табл.3 видно, что во всех случаях наблюдается лучшая адекватность геометрическому распределению.

Полученные результаты были сопоставлены с уровнем и характером загрязнения вод в годы проведения цитогенетических исследований. Данные о химическом загрязнении Мирового океана показывают, что уже в 70 - е годы концентрации хлорорганических соединений, ртуть и свинца во внутренних морях и неритических водах превышали минимальные токсические и пороговые концентрации для наиболее чувствительных видов гидробионтов. С другой стороны, уровни радиоактивного загрязнения открытых океанских вод, а также Черного моря и Дуная после Чернобыльской аварии значительно ниже тех, которые способны индуцировать aberrации хромосом у водных организмов, в том числе у наиболее чувствительных из них - эмбрионов рыб. Очевидно, в этих районах структурные мутации хромосом, которые, как это было показано в

табл.3, распределяются согласно геометрическому закону, вызваны химическим загрязнением среды. Однако, как известно, в природных условиях обычно преобладает комплексное антропогенное химическое загрязнение. В случае эффективного действия нескольких мутагенов можно ожидать усложнения характера поклеточного распределения повреждений хромосом. В качестве одного из примеров приведем распределение aberrаций хромосом по клеткам эмбрионов *Gammarus olivii* из района сброса коммунальных сточных вод, содержащих комплекс мутагенов (Цыпугина В.Г., Куфтаркова Е.А. // Гидробиол. журнал. - 1988. - Т.24. - №6. - С.19 - 20). В этом случае эмпирическое распределение значительно отличалось и от пуассоновского, и от геометрического ($\chi^2 = 44,53$ и $18,26$ соответственно при $n = 1$), однако и здесь налицо была все-таки большая близость к геометрическому распределению.

Из табл.3 следует, что в водоемах 30-километровой зоны распределение aberrаций хромосом по клеткам бентосных ракообразных и червей также больше соответствует геометрическому, хотя здесь можно было ожидать лучшего соответствия пуассоновскому распределению. Химический анализ донных отложений этих водоемов показал в них значительные концентрации хлорорганических соединений (Поликарпов Г.Г., Цыпугина В.Г. // Радиобиология - 1993. - Г.33. - Вып.205 - 213). Очевидно, повреждение хромосом в этих водоемах вызвано сочетанным действием радиоактивного и химического загрязнения, причем последнее вносит существенный вклад в поражение.

Пример. Пуассоновское распределение aberrаций хромосом ($\chi^2 = 1,31$) и резкое отклонение его от геометрического ($\chi^2 = 50,77$) в сочетании с очень высоким уровнем хромосомного мутагена ($30,5\% + 2,30$) было обнаружено нами осенью 1986г. у плотвы в Днепровско-Бугском лимане, что заставило предположить действие высокоэффективных "горячих" частиц. Действительно, в пробе отложений была найдена "горячая" частица ^{103}Ru .

Преимуществом предлагаемого способа является его высокая чувствительность и универсальность. Высокая чувствительность обусловлена тем, что aberrации хромосом - один из наиболее чувствительных показателей повреждения организма. Кроме того, для анализа используются эмбрионы, личинки, молодь, т.е. наиболее чувствительные к повреждающему воздействию стадии онтогенеза. Этот способ применим практически ко всем таксономическим группам гидробионтов из всех звеньев водных экосистем, т.к. aberrации хромосом исследуются на стадии анафазы - телофазы митозы и при этом не требуется детального знания кариотипа исследуемого организма.

Предлагаемый способ может быть использован при оценке и прогнозировании последствий аварии на ЧАЭС для определения относительного вклада радиоактивного и химического загрязнения в поражение природных популяций живых организмов и, в частности, для идентификации эффектов, вызванных γ - и β -излучением "горячих" частиц.

Распределение aberrаций хромосом по клеткам гидробионтов

Распределение aberrаций хромосом по клеткам ги

Вид	Мутаген	Доза или концентрация	Число клеток с		Вид	Год	Местообитание	Число клеток с aberrациями хромосом, %	Число клеток с	
			0	1					0	1
<i>Gammarus olivii</i>	⁹⁰ Sr	12 МБк·л ⁻¹	1756	113	<i>Veilella veilella</i>	1971	Тихий океан	7,0±1,18	783	51
То же	⁹⁰ Sr	22 МБк·л ⁻¹	2410	217	<i>Mysidacea sp.</i>	1978	Атлантический океан	10,6±1,76	247	28
---	⁹⁰ Sr	22 МБк·л ⁻¹	1296	112	<i>Ptenichtys furcatus</i>	1971	Карибское море	4,8±0,46	1558	70
---	⁹⁰ Sr	22 МБк·л ⁻¹	2043	264	<i>Anchylomera</i>					
---	⁹⁰ Sr	17 МБк·л ⁻¹	1407	222	<i>Brossevillei</i>	1985	Средиземное море	5,2±0,43	1293	60
---	⁹⁰ Sr	17 МБк·л ⁻¹	1366	217	<i>Amphlura Stepanovi</i>	1986	Черное море	8,0±1,29	396	33
---	¹³⁷ Cs	11 МБк·л ⁻¹	611	31	<i>Scophthalmus</i>					
---	Внешнее γ-облучение	2 МБк·л ⁻¹	1852	196	<i>maeoticus</i>	1989	То же	2,6±0,18	2659	72
---	То же	5 Гр	1376	170	<i>Nais bretscheri</i>	1988	Дунай	6,1±1,38	303	19
---		5 Гр	1264	201	<i>Naididae sp.</i>	1988	"	5,6±1,72	399	22
---		5 Гр	491	199	Водоемы в 30-километровой зоне кон					
---		5 Гр	498	221	<i>Gammarus sp.</i>	1991	с. Копачи	9,0±0,80	1339	111
<i>Idotea baltica</i>	⁹⁰ Sr	12 МБк·л ⁻¹	1693	131	<i>Stylaria lacustris</i>	1991	То же	8,9±0,87	1946	166
<i>Scorpaena porcus</i>	⁹¹ Y	100 кБк·л ⁻¹	992	137	"	1991	Затон Припяти	12,1±1,21	550	78
<i>Idotea baltica</i>	⁹⁰ Sr	18 МБк·л ⁻¹	681	70	<i>Naididae sp.</i>	1991	Район "рыжего" леса вблизи пос. Янов	6,3±1,46	223	10
<i>Scorpaena porcus</i>	¹⁴ C	74 кБк·л ⁻¹	579	114						
---	Внешнее γ-облучение	4 Гр	1655	238	*Различия достоверно при p>0,99.					
---	То же	6 Гр	1460	232	11	1	2	2,56	17,50*	
<i>Gammarus olivii</i>	Ацетат свинца	1 мг·л ⁻¹	546	24	4	0	1	14,13*	4,85	

Продолжение табл. 1

Вид	Мутаген	Доза или концентрация	Число клеток с числом aberrаций				n	χ-Критерий согласия с распределением	
			0	1	2	3		пуассон.	геомет.
То же	Хлорфен	6,1 мг·л ⁻¹	1623	71	5	0	1	6,19	0,93
<i>Scophthalmus maeoticus</i>	ДДТ	0,1 мг·л ⁻¹	807	77	14	2	2	20,81*	4,09

* Различия достоверно при p>0,99

... и ... Разные генерации, существенно различающиеся по радиочувствительности.

Таблица 2

Распределение aberrаций хромосом по клеткам эмбрионов *Gammarus olivii* при сочетанном действии ¹³⁷Cs и ацетата свинца

Вариант опыта	Число клеток с aberrациями хромосом, %	Число клеток с числом aberrаций				n	χ-Критерий согласия с распределением	
		0	1	2	3		пуассоновским	геометрическим
Интakтный контроль	1,08±0,18							
¹³⁷ Cs 11 МБк·л	5,3±1,05	611	31	1	0	1	0,05	0,20
Ацетат свинца, 1 мг·л ⁻¹	4,3±1,13	546	24	4	0	1	14,13*	4,85
¹³⁷ Cs + ацетат свинца	6,0±0,75	533	29	5	1	1	17,06*	6,38
Внешнее γ-облучение, 3 Гр	11,0±1,51	740	90	4	0	1	0,34	3,92
Ацетат свинца, 1 мг·л ⁻¹	4,8±0,62	926	38	5	0	1	15,14*	5,18
Внешнее γ-облучение + ацетат свинца	12,4±1,14	720	94	5	1	2	1,83	3,80

*Различия достоверно при p>0,99