

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.
ЛОМОНОСОВА»
ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ
НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ 05.03.06 «ЭКОЛОГИЯ И
ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ»
КАФЕДРА РАДИОЭКОЛОГИИ И ЭКОТОКСИКОЛОГИИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**«Радиотоксичность почв из ближней зоны Чернобыльской атомной
электростанции в условиях внешнего контактного облучения корневой
меристемы фитотестера *Allium cepa*»**

*Radiotoxicity of soils samples from the nearest zone of Chernobyl Nuclear Power
Plant under the external contact irradiation of Allium cepa root meristem*

Выполнила студентка
Солодунова Дарья Александровна

Научный руководитель:
к.б.н., старший преподаватель, Столбова В.В.

Рецензент:
к.б.н., н. с. отдела химии и физико-химии почв
ФГБНУ ФИЦ "Почвенный институт им. В.В.
Докучаева"
Котельникова Анна Дмитриевна

Допущена к защите
Зав. кафедрой
д.б.н., проф. Щеглов А.И.

Москва 2021

Оглавление

Введение	3
Литературный обзор	5
Глава 1. Общие сведения об аварии и загрязнении ОС	5
1.2 Оценки выбросов.....	7
1.3 Зоны загрязнения.....	8
Глава 2. Бета-излучение	9
Глава 3. Цитогенетический мониторинг	10
3.1 Обоснование необходимости проведения цитогенетического мониторинга	10
3.2 Характеристика метода <i>Allium test</i>	11
3.3 Цитогенетические показатели	12
Методика	16
Глава 4. Метод твердофазного биотестирования	16
Глава 5. Радиометрия образцов почв	18
Глава 6. Статистический анализ данных цитогенетического исследования при оценке генотоксичности почв по методу твердофазного тестирования с <i>Allium sera</i>	19
Экспериментальная часть	19
Глава 7. Радиометрия образцов почв: результаты и обсуждение	19
Глава 8. Твердофазное фитотестирование, <i>Allium test</i>	26
Глава 9. Анализ взаимосвязей показателей	32
9.1. Анализ изменения фазных индексов с расстоянием	32
9.2. Анализ изменения фазных индексов с увеличением дозы гамма-излучения	33

9.3. Анализ изменения фазных индексов с увеличением интенсивности бета-излучения.....	34
Выводы	40
Список литературы	42

Введение

В настоящее время возрастает воздействие внешних факторов на организмы, в том числе на генетический аппарат последних. Эффекты воздействия хронического облучения на человека и представителей биоты (Amiro, 1997) находятся сейчас в центре внимания радиоэкологов (Salbu, 2009; Ulsh et al., 2003; Zaitsev et al., 2014). Понимание механизмов действия радиации в малых дозах может помочь приблизиться к пониманию общих проблем, связанных с загрязнением окружающей среды химическими и другими факторами. Удобной базой для изучения хронического излучения являются территории бывших радиационных аварий, полигонов испытаний ядерного оружия, места захоронения радиоактивных отходов и т.д. В этих местах радиоэкологами до сих пор фиксируются эффекты радиации, которые часто называются эффектами малых доз, например, повышенная частота хромосомных aberrаций в клетках биоты, проявление нестабильности генома, радиационный гормезис, явление радиоадаптации популяции. Ряд исследователей связывают механизм реализации данных явлений с нарушениями в генетическом аппарате клеток или с механизмами репарации данных нарушений. Наиболее простым и доступным методом изучения этих нарушений является биотестирование в стандартных лабораторных условиях с использованием цитогенетических показателей при простом анафазном варианте цитогенетического анализа. Однако проблемой биотестирования радионуклидного загрязнения почв в отдаленный период аварии является так называемый процесс «старения» радионуклидов, которые необратимо закрепляются кристаллическими решётками минеральной части

почв, что полностью исключает тестирование вытяжек из почв, следовательно, тестирование можно проводить только непосредственно на твердой фазе почв. Данный метод твердофазного тестирования недавно был разработан на нашей кафедре.

Цель: оценить радиотоксичность образцов почвы, отобранных в ближней зоне ЧАЭС в 1998 году, методом твердофазного биотестирования, имитирующим воздействие радиации варьирующего спектра с преобладанием β -компоненты на процесс митоза в клетках корневой меристемы.

Задачи:

1. Проанализировать данные радиометрии образцов почв из ближней зоны и оценить вклад бета-компоненты в общий поток ионизирующего излучения от загрязненных радионуклидами Чернобыльского выброса почв в отдаленный период времени после аварии.
2. Провести цитогенетический анализ биоматериала, полученного в ходе твердофазного биотестирования с луком репчатым *Allium cepa* L. и определить значения митотического и фазных индексов опытных и контрольных образцов.
3. Оценить статистическими методами достоверность различий с контролем цитогенетических показателей процесса митоза в клетках биотестера *A. cepa* при контактном внешнем облучении.
4. Проанализировать выявляемые взаимосвязи между показателями дозовых и потоковых характеристик излучений варьирующего спектра и цитогенетическими показателями радиотоксичности.

Литературный обзор

Глава 1. Общие сведения об аварии и загрязнении ОС

26 апреля 1986 года на Чернобыльской АЭС, расположенной близ города Припять, произошла одна из наиболее тяжёлых по многим аспектам авария в истории мировой атомной энергетики. По одной из версий причиной аварии послужила халатность персонала и не до конца продуманный эксперимент по использованию механической энергии ротора для внутренних нужд энергоблока в условиях обесточивания. Непосредственно после аварии начался пожар, на борьбу с которым были брошены все силы в начальный период после взрыва (Алесахин и др., 2001).

К особенностям реактора РБМК-1000, способствующим крайне тяжелым радиационным последствиям аварии, относятся: возможность проявления положительного парового коэффициента реактивности, определяющего поведение нейтронной мощности при авариях; высокая чувствительность нейтронного поля к возмущениям реактивности, требующая сложной системы управления для стабилизации распределения энерговыделения в активной зоне; большое количество тепловой энергии, аккумулированной в металлоконструкциях, твэлах и графитовой кладке реактора; несовершенство системы аварийной остановки реактора; отсутствие защитной оболочки (контейнента) (Авария на Чернобыльской АЭС..., 1986; Jones et al., 2003).

Оценки радионуклидного состава аварийных выбросов ЧАЭС представлены в табл. 1 (Алесахин и др., 2001).

Нуклид	Активность выброса $\times 10^{15}$ Бк (%)	Активность выброса $\times 10^{15}$ Бк (%)
^{85}Kr	33 (100%)	33 (100%)
^{89}Sr	81 (4%)	81 (3,5-4,5%)
^{90}Sr	8 (4%)	8 (3,5-4,5%)
^{95}Zr	140 (3,2%)	170 (3,5%)

⁹⁹ Mo	110 (2,3%)	210 (3,5-6%)
¹⁰³ Ru	120 (2,9%)	170 (3,5-6%)
¹⁰⁶ Ru	60 (2,9%)	30 (3,5-6%)
¹³¹ I	270 (20%)	1200-1700 (50-60%)
¹³² Te	48 (15%)	1000 (10-60%)
¹³³ Xe	1700 (100%)	6500 (100%)
¹³⁴ Cs	18 (10%)	44-48 (23-43%)
¹³⁷ Cs	37 (13%)	70-85 (23-43%)
¹⁴⁰ Ba	160 (5,6%)	170 (3,5-6%)
¹⁴¹ Ce	100 (2,3%)	200 (3,5%)
¹⁴⁴ Ce	90 (2,8%)	140 (3,5%)
²³⁹ Np	440 (3%)	1700 (3,5%)
²³⁸ Pu	0,03 (3%)	0,03 (3,5%)
²³⁹ Pu	0,026 (3%)	0,03 (3,5%)
²⁴⁰ Pu	0,037 (3%)	0,044 (3,5%)
²⁴¹ Pu	5,2 (3%)	5,9 (3,5%)
²⁴² Cm	0,78 (3%)	0,93 (3,5%)

Получение точных и полных данных о радиоактивных выбросах ЧАЭС было весьма затруднено из-за невозможности прямых измерений на разрушенном блоке; сложного характера физико-химических процессов формирования выброса, определяемого как внутренними процессами хода аварии, так и внешними воздействиями (засыпкой верхней части реактора); изменяющихся метеоусловий в регионе ЧАЭС в течение относительно длительного периода действия источника выбросов; сложной радиационной обстановки в помещениях IV блока ЧАЭС, на площадке и в ближней зоне.

1.2 Оценки выбросов

Оценки выбросов радионуклидов были получены расчетным путем с использованием моделей переноса примесей в атмосфере (Авария на Чернобыльской АЭС..., 1986). В качестве исходной информации использовались результаты исследований радионуклидного состава проб аэрозолей, отбирившихся над аварийным блоком с 26.04.1986г.; аэрогаммасъемки района ЧАЭС; анализа проб выпадений, метеонаблюдений в районах перемещения загрязненных воздушных масс (в основном использовались данные о радиоактивном загрязнении природных сред на территории СССР). Суммарный выброс продуктов деления (без инертных радиоактивных газов) был оценен равным $1,85 \cdot 10^{18}$ Бк (50 МКи) (по данным, приведенным к 06.05.86 г. с учетом радиоактивного распада). Точность результатов расчетов принята как 50 % (Авария на Чернобыльской АЭС..., 1986). В этой сумме не учитывались инертные радиоактивные газы; было предположено, что их выброс достиг 100 % накопленного количества (Алесахин и др., 2001).

Суммарная активность радиоактивных веществ составила около 14 ЭБк, в том числе 1,8 ЭБк ^{131}I , 0,085 ЭБк ^{137}Cs , 0,01 ЭБк ^{90}Sr и 0,003 ЭБк радиоизотопов плутония. Около 50% общего объема выбросов составляли благородные газы. Более чем на 200 000 км² территории Европы уровень загрязнения ^{137}Cs превысил 37 кБк/м². Свыше 70 процентов этой территории находилось в трех наиболее пострадавших странах – Беларуси, России и Украине. Выпадения были крайне неравномерными, поскольку они усиливались в тех зонах, где во время прохождения загрязненных воздушных масс шел дождь. Большая часть радиоизотопов стронция и плутония осела в 100-километровой зоне от разрушенного реактора из-за более крупных размеров частиц (Наследие Чернобыля..., 2003-2005).

В начальный период после аварии наибольшую опасность представляли относительно короткоживущие изотопы ^{131}I . Основным направлением

распространения загрязнения оказалось западное и северо-западное. При этом отдельные «островки» загрязнения обнаруживались и в других направлениях от эпицентра выброса. Кратковременное увеличение суммарной активности бета-излучателей в атмосферных выпадениях было зарегистрировано и во многих субъектах Российской Федерации, в том числе в Брянской, Тульской, Калужской, Орловской, Воронежской, Смоленской, Горьковской, Ростовской, Тамбовской и Пензенской областях, на Кольском полуострове, в Свердловске, Хабаровске и Владивостоке.

В первый период после аварии наибольший вклад в радиоактивное загрязнение почвы давали сравнительно короткоживущие нуклиды: ^{89}Sr , ^{95}Zr , ^{95}Nb , ^{134}Te , ^{132}Te , ^{132}I , ^{239}Np , ^{40}Ba , ^{140}La . В ближней к месту аварии зоне почвы были обогащены ^{95}Zr , ^{95}Nb , ^{140}Ce , ^{144}Ce , в дальней - ^{131}I , ^{137}Cs (Fleishman et al., 1994) и ^{134}Cs . Максимум содержания ^{131}I в почве наблюдался в период 28 апреля — 9 мая в зависимости от траекторий переноса аварийного выброса и местных метеоусловий. В ряде случаев наблюдались вторичные максимумы содержания ^{131}I , связанные с вымыванием ^{131}I из нижней тропосферы. Наибольшее загрязнение местности ^{131}I наблюдалось в северной Украине, восточной Белоруссии и примыкающих районах центральной области России. Отдельные «пятна» загрязнений ^{131}I имели место у западной границы СССР в районе Балтийска — Калининграда, а также в районах между Гомелем и Брянском и южнее Тулы (Алесахин и др., 2001). В дальнейшем после распада короткоживущих радионуклидов ^{137}Cs , ^{134}Cs и ^{90}Sr стали определяющими в загрязнении территории.

1.3 Зоны загрязнения

Выделяют три основных зоны загрязнения: центральную, северо-северо-восточную и северо-восточную. В состав центральной зоны входит ближняя зона, в основном, расположенная западнее и северо-западнее ЧАЭС. Наиболее интенсивные радиоактивные выпадения характерны для 30-км зоны. В этой зоне, а также в некоторых районах, расположенных в западном и северо-западном

направлении от ЧАЭС, плотности загрязнения территории ^{137}Cs превышают 1500 кБк 2 . Северо-северо-восточная зона, включающая в себя загрязненные районы Гомельской, Могилевской и Брянской областей, расположена примерно в 200 км от ЧАЭС. Она сформировалась, в основном, в результате радиоактивных выпадений в период 27-29 апреля 1986 г. Плотности загрязнения ^{137}Cs в некоторых населенных пунктах этой зоны превышали 1500 кБк 2 . Северо-западная зона расположена примерно в 500 км от ЧАЭС, в нее входят некоторые районы Калужской, Тульской и Орловской областей. Она была образована в период атмосферных радиоактивных выпадений в конце апреля 1986 г. Плотности загрязнения территории ^{137}Cs в этой зоне, как правило, не превышают 600 кБк 2 . За пределами этих наиболее загрязненных территорий находится довольно много районов загрязнения с плотностью выпадений ^{137}Cs 37-200 кБк 2 (Алесахин и др., 2001).

Глава 2. Бета-излучение

Выброшенные в атмосферу продукты ядерного деления (ПЯД) увеличивают суммарную бета-активность аварийных выпадений. Бета-излучение – корпускулярное электронное или позитронное ионизирующее излучение с непрерывным энергетическим спектром. Характеризуется относительно большей по сравнению с альфа-излучением проникающей способностью. β -распад объединяет три самостоятельных вида радиоактивных превращений: электронный распад, позитронный распад и К-захват. Основные β -излучатели: ^{60}Co , ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{129}I , ^{130}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs , ^{210}Pb , ^{228}Ra , ^{40}K .

Энергии бета-частиц распределены непрерывно от нуля до некоторой максимальной энергии, зависящей от распадающегося изотопа; эта максимальная энергия лежит в диапазоне от 2,5 кэВ (для рения-187) до десятков МэВ (для короткоживущих ядер, далёких от линии бета-стабильности). Бета-лучи под действием электрического и магнитного полей отклоняются от прямолинейного направления. Скорость частиц в бета-лучах близка к скорости

света. Бета-лучи способны ионизировать газы, вызывать химические реакции, люминесценцию, действовать на фотопластинки.

Слой любого вещества с поверхностной плотностью порядка 1 г/см^2 (например, несколько миллиметров алюминия или несколько метров воздуха) практически полностью поглощает бета-частицы с энергией около 1 МэВ , что позволяет довольно легко защищаться от внешнего бета-излучения, но не помогает от внутреннего облучения, в особенности при попадании бета-излучающих радионуклидов способных накапливаться и длительное время находиться в организме, к примеру, ^{90}Sr .

Глава 3. Цитогенетический мониторинг

3.1 Обоснование необходимости проведения цитогенетического мониторинга

Окружающая среда, являясь средой обитания живых организмов, содержит естественные и искусственные мутагены. Исходя из этого перед исследователями стоит задача выявить эти мутагены, понять механизм их действия на живые клетки, предложить методы защиты от них и разработать методы снижения и предотвращения их воздействия на генетический аппарат организмов. В настоящее время выявлено глобальное загрязнение окружающей среды техногенными продуктами с повышенной мутагенной активностью, которые несут в себе опасность воздействия на генетический аппарат живых существ. Для проведения цитогенетического мониторинга окружающей среды необходимо найти универсальную тест-систему, которая будет способна выявлять мутагены в окружающей среде. При этом к особенностям данной системы должны также относиться неприхотливость тест-объекта, его «отзывчивость» на воздействие агрессивных факторов среды, иногда важно не только универсальность, но и избирательность данного объекта, показательность и воспроизводимость методики, в которой используется данный объект, невысокая стоимость тест-системы, а также возможность перенести результаты

исследования этого объекта на клетки других живых организмов. Таким образом подходящий тест-объект можно применять при проведении цитогенетического мониторинга- системы мер слежения, оценки и прогнозирования состояния цитогенетической системы при спонтанном и индуцированном мутагенезе. Целью такого мониторинга является регистрация возникающих цитогенетических нарушений, в первую очередь хромосомных аномалий, и контроль за их фенотипическим проявлением и распространением в популяциях, а также обнаружение мутаций в тест-системах близких к человеку. На сегодняшний день разработаны высокочувствительные и относительно простые цитогенетические методы, основанные на оценке структурных и численных изменений хромосом, многоядерный тест, исследование активности ферментов, выявление изменений митотического аппарата (Калаев, 2004).

3.2 Характеристика метода *Allium test*

Для проведения нашего исследования был использован универсальный метод биотестирования- *Allium test*. Он позволяет оценить влияние различных факторов среды на живые клетки, в особенности мутагенных факторов, таких как токсическое действие соединений и ионизирующее излучение. *Allium test* является одним из немногих прямых методов измерения повреждений в системах, подверженных воздействию мутагенов или потенциальных канцерогенов, и позволяет оценить последствия этих повреждений путем наблюдения за хромосомными изменениями. Для этого необходимо, чтобы исследуемый образец находился в процессе митоза, тогда можно идентифицировать цитотоксические эффекты и изменения в течение клеточного цикла (Tedesco, 2012). Выбранный метод прост в использовании (Leme, Marin-Morales, 2009), т.к. изучаемым объектом является лук репчатый *Allium cepa*, семена которого быстро прорастают, не требуют особого ухода и, главное, реакция клеток меристемы кончика корешка *A. cepa* на агрессивные факторы среды схожа с реакцией на эти факторы клеток человеческого организма. Поэтому используя *A. cepa* в качестве тест-объекта мы в некоторой степени

можем перенести результаты исследований на человеческий организм. Allium test рекомендован экспертами ВОЗ как стандарт при цитогенетических исследованиях. Данный метод нашёл широкое применение в исследованиях загрязнённости почвенного покрова (Багдасарян, 2004), исследовании оценки последствий воздействия ЭМИ УВЧ (ультравысокой частоты), например, от сотовых телефонов (Песня и др., 2010), исследовании токсического и генотоксического эффектов синтетических пищевых красителей (Песня и др., 2012), оценке цитогенетического действия диоксина на клетки меристемы *A. cepa* (Шереметьева и др., 2012).

Проведение исследования с использованием Allium test подразумевает расчёт цитогенетических показателей: фазных индексов, в том числе митотического индекса и затем выявление и определение патологий митоза, если таковые будут обнаружены.

3.3 Цитогенетические показатели

При изучении деления клеток необходимо определить митотическую активность ткани, которую можно выразить через показатель, называемый митотическим индексом. Митотический индекс (МИ) - отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу клеток исследуемой ткани. Часто митотический индекс выражают в промилле, т.е. числе митозов на тысячу клеток ткани. Для этого подсчитывают число митозов в определённом количестве давленных препаратов, при этом учитывая общее число клеток на этих препаратах. Определяют отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном препарате и умножают на 1000 (Паушева, 1988).

Помимо митотического индекса производится расчёт фазных индексов: профазного, метафазного, анафазного, телофазного и ана-телофазного. Расчёт и характеристика каждого из перечисленных индексов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Расчёт и характеристика фазных индексов.

Индекс	Расчёт индекса	Характеристика
--------	----------------	----------------

<p>ПИ</p>	$P_i = \frac{P}{(P+M+A+T)} * 100\%$ <p>где знаменатель-сумма клеток, находящихся на стадии про-, мета-, ана- и телофазы, а Р- количество профаз в просчитанных клетках</p>	<p>Процент клеток в профазе митоза от общего числа проанализированных клеток</p>
<p>МИ</p>	$M_i = \frac{M}{(P+M+A+T)} * 100\%$ <p>где знаменатель-сумма клеток, находящихся на стадии про-, мета-, ана- и телофазы, а М- количество метафаз в просчитанных клетках</p>	<p>Процент клеток в метафазе митоза от общего числа проанализированных клеток</p>
<p>АИ</p>	$A_i = \frac{A}{(P+M+A+T)} * 100\%$ <p>где знаменатель-сумма клеток, находящихся на стадии про-, мета-, ана- и телофазы, а А- количество анафаз в просчитанных клетках</p>	<p>Процент клеток в анафазе митоза от общего числа проанализированных клеток</p>
<p>ТИ</p>	$T_i = \frac{T}{(P+M+A+T)} * 100\%$ <p>где знаменатель-сумма клеток, находящихся на стадии про-, мета-, ана- и телофазы, а Т-</p>	<p>Процент клеток в телофазе митоза от общего числа проанализированных клеток</p>

	количество телофаз в просчитанных клетках	
А-ТИ	$A-T_i = \frac{(A+T)}{(P+M+A+T)} * 100\%$ <p>где знаменатель-сумма клеток, находящихся на стадии про-, мета-, ана- и телофазы, а (А+Т)- количество ана- и телофаз в просчитанных клетках</p>	Процент клеток в анафазе и телофазе митоза от общего числа проанализированных клеток

Митоз - одна из важнейших составляющих жизненного цикла соматических клеток. Посредством этого процесса клетка делится, а значит, передаёт наследственную информацию дочерним клеткам. Как известно, подготовка к процессу митоза включает в себя следующие процессы: репродукция ДНК, удвоение массы клетки, синтез белковых компонентов хромосом и митотического аппарата, удвоение клеточного центра, накопление энергии для цитотомии. Нарушение нормального течения митоза, приводящее к возникновению хромосомных aberrаций - тип мутации, который изменяет структуру хромосом, и неравномерному распределению хромосом между дочерними ядрами называется патологией митоза. Структурные перестройки образуются в результате хромосомного разрыва и воссоединения, что влияет на содержание и форму одной или нескольких хромосом и изменяет распределение генов внутри генома (Moore, Best, 2001). Патологию митоза могут вызвать ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, высокая температура, химические вещества, в том числе канцерогены и митотические яды и др. Велико количество патологических митозов при малигнизации тканей (Фель, 1977). Патологией может быть затронута любая из четырёх фаз митоза. На основе этого

И. А. Алов (1972) создал классификацию патологий митоза, согласно которой выделяются следующие типы патологий митоза:

1. Повреждение хромосом:

1. задержка клеток в профазе;
2. нарушение спирализации и деспирализации хромосом;
3. фрагментация хромосом;
4. образование мостов между хромосомами в анафазе;
5. раннее разъединение сестринских хроматид;
6. повреждение кинетохора.

2. Повреждение митотического аппарата:

1. задержка развития митоза в метафазе;
2. рассредоточение хромосом в метафазе;
3. трехгрупповая метафаза;
4. полая метафаза;
5. многополюсные митозы;
6. асимметричные митозы;
7. моноцентрические митозы;
8. К-митозы.

3. Нарушение цитотомии:

1. преждевременная цитотомия;
2. задержка цитотомии;
3. отсутствие цитотомии.

При значительных патологиях митоза может возникнуть гибель клетки.

Методика

Глава 4. Метод твердофазного биотестирования

Одним из методов оценки загрязнения почв радионуклидами является краткосрочный метод твердофазного биотестирования образцов почвы на предмет их генотоксичности, разработанный сотрудниками кафедры Радиоэкологии и экотоксикологии факультета Почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова. Учитывая необратимый характер фиксации техногенных радионуклидов на органоминеральных фракциях почвы, этот метод моделирует условия внешнего облучения представителей биоты, непосредственно контактирующих с загрязненными почвами. Использование цитогенетических показателей в радиоэкологических исследованиях позволяет проанализировать эффекты влияния на генетический аппарат клетки, механизм воздействия и интенсивность потока ионизирующих излучений на организмы, а также механизмы репарации и сопротивляемость живых объектов окружающей среды данному агрессивному фактору. Наиболее простой и универсальной процедурой обнаружения способности ионизирующих облучений оказывать кластогенное воздействие на генетический аппарат клеток является анализ структурных мутаций хромосом с использованием недифференцированного окрашивания генетического материала без остановки деления на стадии метафазы (анафазный метод). В качестве тест-функций используются такие интегральные показатели, как общая частота патологий митоза (мейоза) и/или частота хромосомных aberrаций (Столбова и др., 2019).

При проведении исследования были использованы метод почвенных пластинок (Столбова и др., 2018) и метод *Allium test* с предварительным проращиванием биотестера. Фитотестером служили семена лука репчатого *A. sera* сорта Штуттгартен ризен производства фирмы «Королевский урожай».

Метод почвенных пластинок

Контрольный (предоставлен сотрудником Почвенного института) и опытные образцы воздушно-сухой почвы, растёрли и просеяли через сито.

Просеянную почву помещали в чашки Петри диаметром 5,5 см и увлажняли из расчёта 10 мл воды на 17-18 г почвы. Полученную пасту разравнивали шпателем для получения ровной поверхности почвенной пластины. Подготовленные таким образом пластины помещали в чашки Петри диаметром 10 см, предварительно налив на дно немного воды для создания условий влажной камеры. Аналогично в каждой серии опыта готовили камеры для контрольных биотестов: пластины с твёрдым инертным субстратом (почва, кварцевый песок, перлит), а также с водопроводной водой (для последней применяли метод рулонной культуры на фильтровальной бумаге).

Прединкубационная подготовка фитотестера

Сухие семена *A. сера* помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри диаметром 10 см и проращивали их в темноте в условиях влажной камеры в течение 48 часов. В опыт брали только проросшие семена.

Основная процедура биотеста

В чашки Петри диаметром 5,5 см с подготовленными образцами почвы и контрольных твёрдых субстратов (песок, дерново-подзолистая почва, вода и перлит) помещали проросшие семена и вновь оставляли их в условиях влажной камеры при постоянной температуре и без доступа света на 24 часа. Одновременно с этим проводили ту же процедуру с почвенными пластинами, изготовленными из почв ближней зоны ЧАЭС.

Полученный биоматериал отмывали от субстрата в фарфоровых чашках в водопроводной воде и помещали его в стеклянные баночки с фиксатором Кларка на 2-14 суток, предварительно присвоив каждому образцу шифр. Затем для дальнейшего хранения образцы были переведены в 70%-й этиловый спирт (v/v) с предварительной отмывкой от фиксатора спиртом такой же концентрации и помещены в холодильник.

Для подготовки образцов к микроскопированию мы использовали стандартную методику приготовления препаратов из корневой меристемы. Для этого 1-2 корешка извлекались из спиртового раствора и промывались в керамической чашке (проводка 1) в дистиллированной воде. Затем окрашивали

проросток 2%-м ацетоорсеином при тайном кипении, а затем оставляли под часовым стеклом на 30 минут. После этого корешки отмывались от красителя в течение 5-10 минут в 45%-м растворе уксусной кислоты. Для приготовления стандартных давленных препаратов отделяли от окрашенного корня апикальный участок не менее 2 мм длиной и помещали на капельку уксусной кислоты на предметном стекле. Анализ клеток проводится с помощью светопольной микроскопии в проходящем свете при увеличении 10×40 с использованием синего светофильтра.

Глава 5. Радиометрия образцов почв

Перед проведением твердофазного тестирования была проведена радиометрия образцов почвы, отобранных в 1998 году в ближней зоне аварии на ЧАЭС в районе поселков Новошепеличи, Копачи и Дитятки. В качестве контрольного использовались образцы почвы, предоставленные сотрудником почвенного института, промытого песка, коммерческого субстрата «Перлит» и водопроводной воды. Мы оценивали уровень гамма-, бета- и альфа излучений от почв в непосредственной близости от выровненной поверхности насыпного воздушно-сухого образца. Данные условия могут имитировать ситуацию внешнего облучения представителей биоты в биогеоценозе. Для измерения интенсивности β - и α излучения был использован счётчик частиц СКС-99 «Спутник» (БДС №671, БУ 16-25) с контрольным источником ^{90}Sr - ^{90}Y №588-2008. Фон за время измерения ($\beta + \alpha$ – счётчик): от 0,372 до 0,682 имп/с. Калибровка источника: 99 имп/с. Энергия измерения: 900-9000 кэВ. При измерении мощности дозы γ -излучения использовался дозиметр-радиометр МКС-АТ 6130С.

Глава 6. Статистический анализ данных цитогенетического исследования при оценке генотоксичности почв по методу твердофазного тестирования с *Allium cepa*

Данные, полученные методом твердофазного фитотестирования образцов почв, были обработаны методами математической статистики. Для определения доверительного интервала доли было применено долевое преобразование Фишера. Величина доли подчиняется закону биномиального распределения и при больших объёмах выборки стремится к нормальному распределению. При малых или больших значениях доли (приближающихся к 0 или 1) процедуры статистического анализа для нормально распределённых величин не обоснованы. Чтобы применение статистик нормального распределения было обосновано, мы применили фи-преобразование величины долей в углы, для которых доказано нормальное распределение. С помощью специальных таблиц были определены значения углов, соответствующих значениям долей, после чего рассчитывались ошибка репрезентативности и доверительный интервал углов с последующим преобразованием углов обратно в доли. Достоверность различий значений митотического индекса в опыте и контроле оценивалась на основе принятия либо отвержения нулевой гипотезы об отсутствии статистических различий в результатах с уровнем значимости $\alpha=0.05$. Критерием принятия решения служит Т-критерий Стьюдента. За критическое значение Т-критерия было взято 1.96, что соответствует бесконечному количеству степеней свободы.

Экспериментальная часть

Глава 7. Радиометрия образцов почв: результаты и обсуждение

Результаты радиометрии образцов почв ближней зоны ЧАЭС приведены в таблице 3.

Таблица 3. Радиометрия почвенных образцов ближней зоны ЧАЭС.

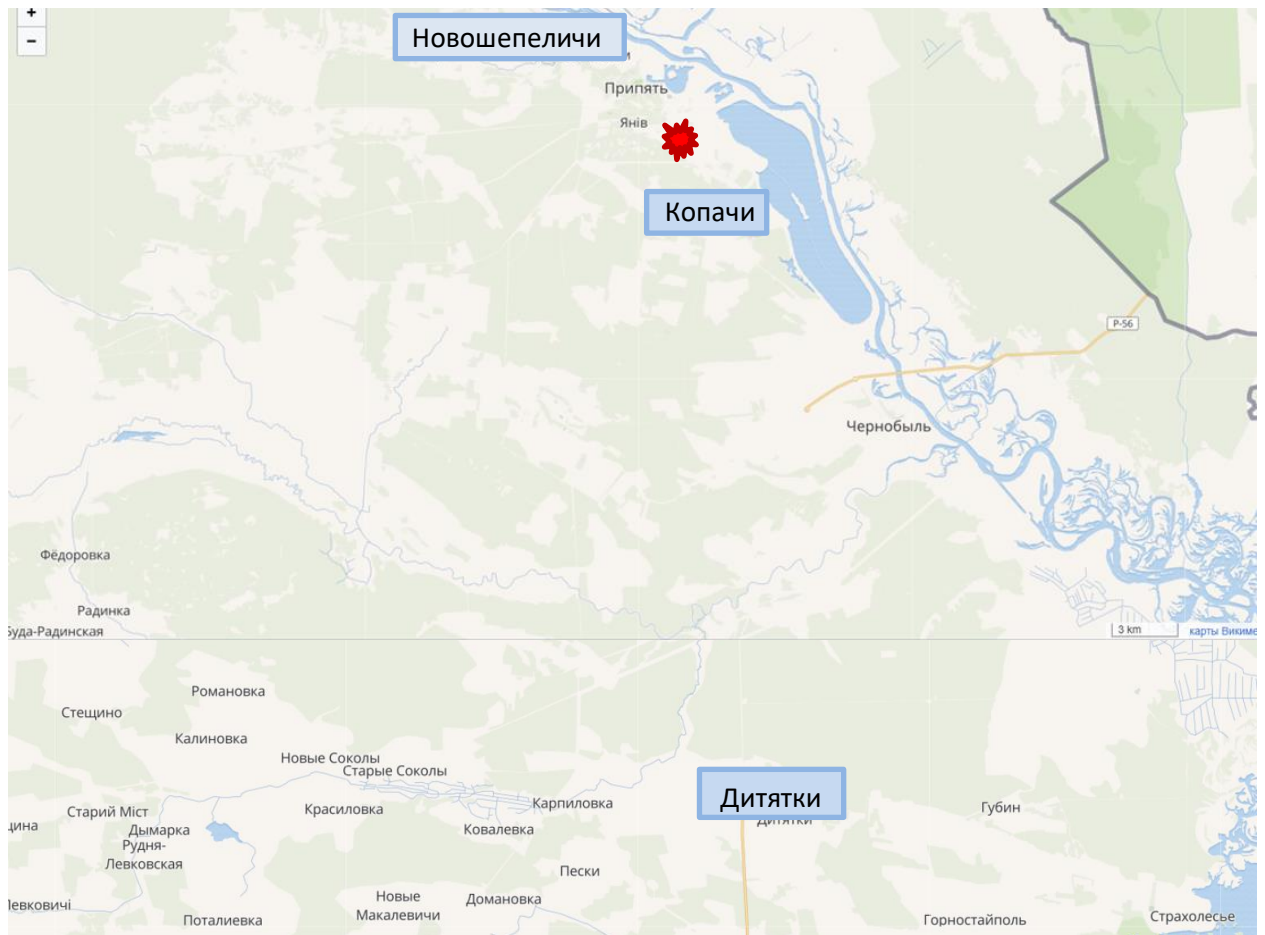
Пункт отбора пробы	Расстояние от эпицентра, км	Интенсивность потока β -частиц, [импульс/с* см^2]	Мощность дозы γ -излучения, [$\mu\text{Sv/h}$]	Интенсивность потока α -частиц, [импульс/с* см^2]
Новошепеличи	2,5-4,5	192,7	2,65	0,0
	4,5-5,5	88,1	1,51	0,0
	5,5-9,5	12,2	0,32	0,0
	9,5-14,5	6,0	0,07	0,0
Копачи	1-4	7,9	0,20	0,0
Дитятки	6-7	5,4	0,08	0,0

Также была проведена радиометрия образцов, которые использовались в качестве контрольных при оценке радиотоксичности почв методами цитогенетики: водопроводной воды, стандартной дерново-подзолистой почвы, промытого песка и коммерческого субстрата «перлит». Результаты измерений представлены в таблице 4.

Таблица 4. Радиометрия контрольных образцов.

Контроли	β [импульс/с* см^2]	γ [$\mu\text{Sv/h}$]
Вода	0,08 \pm 19%	0,475 \pm 0,046
Почва	0,06 \pm 20%	0,250 \pm 0,042
Песок	0,06 \pm 17%	0,035 \pm 0,043
Перлит	0,08 \pm 19%	0,074 \pm 0,040

Пункты отбора проб почвы из ближней зоны ЧАЭС в 1998 году представлены на рисунке 1.



Эпицентр взрыва на карте схематически обозначен красной звездой.

Рисунок 1. Пункты отбора проб почв в 1998 году. Ближняя зона ЧАЭС

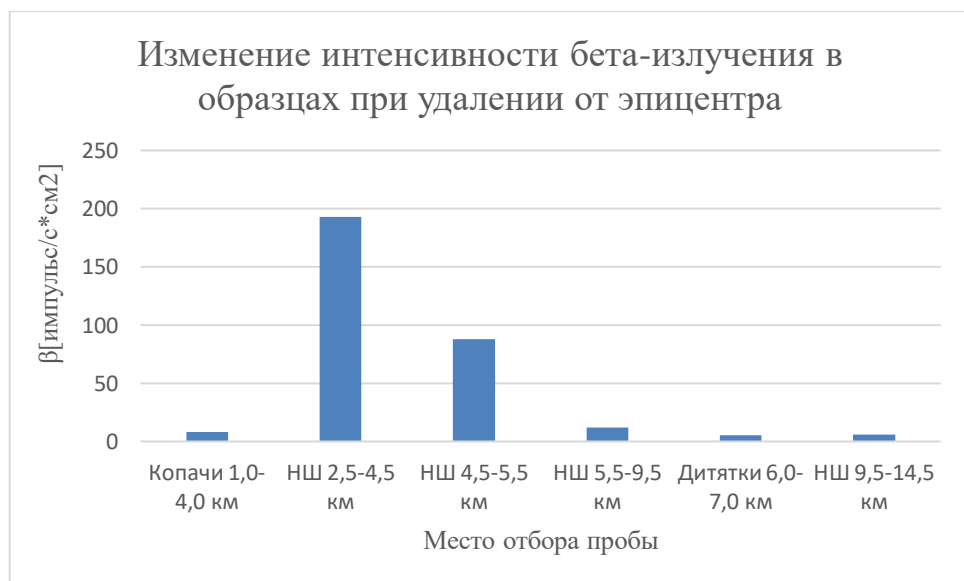


Рисунок 2. Изменение активности бета-излучения в образцах при удалении от эпицентра.

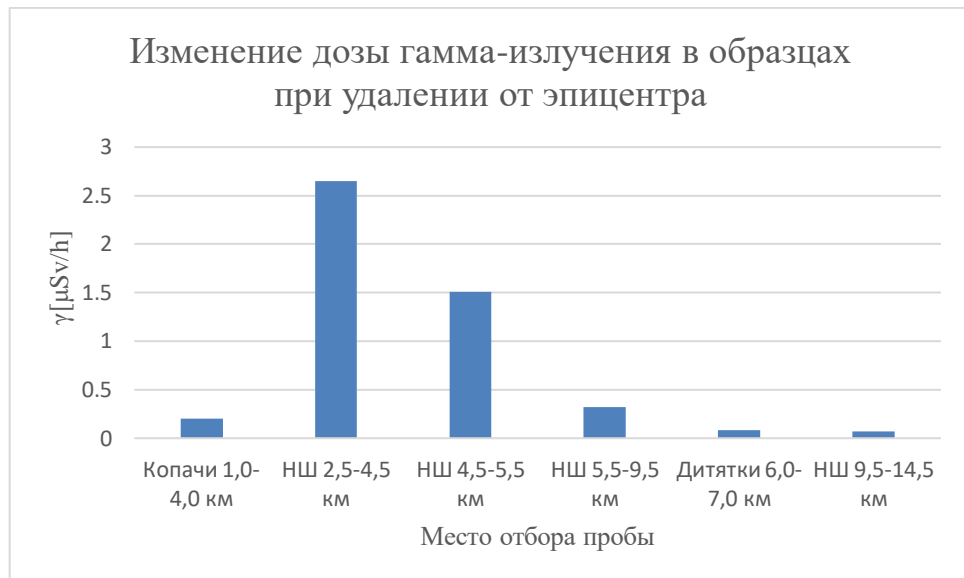


Рисунок 3. Изменение дозы гамма-излучения в образцах при удалении от эпицентра.

Как видно из таблицы 3, рисунка 1, рисунка 2 и рисунка 3, мы не можем выявить однозначного тренда между расстоянием от эпицентра аварии и интенсивностью потока бета- и гамма-излучения. Например, в наиболее близко расположенном от эпицентра пункте отбора проб – Копачах - интенсивность потока бета- излучения составила $7,9 \text{ импульс/с}\cdot\text{см}^2$, а гамма-излучения- $0,20 \text{ }\mu\text{Sv/h}$. При этом в Новошепеличах, что находятся дальше от эпицентра аварии, чем Копачи, интенсивность потока бета-излучения составила от $6,0$ до $192,7 \text{ импульс/с}\cdot\text{см}^2$, а гамма-излучения от $0,07$ до $2,65 \text{ }\mu\text{Sv/h}$. Наши измерения подтверждают литературные данные о первоначальной неоднородности, мозаичности радиоактивных выпадений Чернобыльского выброса, которая во много была обусловлена переменчивыми погодными условиями после аварии. Поэтому мы не получили точной зависимости степени загрязнения почв от одного фактора – удаленности от эпицентра выброса. Кроме того, такие результаты могут быть связаны с

различным радионуклидным составом загрязнения почв на различных участках, что закономерно изменяет пропорцию бета- и гамма- составляющих потока ионизирующих излучений.

Измерения показали, что больший удельный вес в потоке излучений от почв ближней зоны имеет бета-составляющая, что характерно для смеси ПЯД. Как известно, смесь продуктов деления состоит в основном из бета- и гамма-излучателей и удельный вес потока бета-частиц и гамма-квантов меняется для «свежей» и «старой» смеси. В настоящее время, когда все короткоживущие нуклиды подверглись распаду, вклад в β -излучение дают относительно долгоживущие радиоактивные изотопы цезия и стронция. Отношение бета-компоненты к гамма-компоненте с известной долей условности в исследуемых образцах почв ближней зоны ЧАЭС и контрольных образцах представлено в таблице 5.

Таблица 5. Отношение бета-компоненты к гамма-компоненте в исследуемых образцах

Пункт отбора пробы	Расстояние от эпицентра, км	$\beta : \gamma$
Новошепеличи	2,5-4,5	72:1
	4,5-5,5	58:1
	5,5-9,5	38:1
	9,5-14,5	85:1
Копачи	1-4	39:1
Дитятки	6-7	67:1
Контроли		
Вода		0,16:1
Почва		0,24:1
Песок		1,71:1
Перлит		1,08:1

Как видно из таблицы 5, доля бета-излучения в потоке ионизирующего излучения от почв ближней зоны ЧАЭС в десятки раз больше, чем от контрольных образцов. Это связано с тем, что в почвах ближней зоны ЧАЭС, где, соответственно, ионизирующее излучение формируется преимущественно потоком частиц от бета-излучателей, последние представлены продуктами ядерного деления.

При проведении радиометрии не было зарегистрировано ни одной альфа-частицы. Наиболее вероятно, это может быть связано с тем, что альфа-частицы обладают низкой проникающей способностью и могли быть поглощены материалом образца или частично чашкой Петри, в которую был помещён образец. К естественным альфа-излучателям относят ^{210}Po ($T_{1/2}=138$ суток), ^{224}Ra ($T_{1/2}=3,66$ суток), ^{226}Ra ($T_{1/2}=1600$ лет), ^{232}Th ($T_{1/2}=14,05$ млрд лет), ^{234}U ($T_{1/2}=2,45 \cdot 10^5$ лет), ^{238}U ($T_{1/2}=4,46 \cdot 10^9$ лет); к техногенным - ^{239}Pu ($T_{1/2}=2,41 \cdot 10^4$ лет), ^{240}Pu ($T_{1/2}=6564(11)$ лет), ^{241}Am ($T_{1/2}=432,6$ года), ^{242}Cm ($T_{1/2}=162$ дня), ^{244}Cm ($T_{1/2}=18,1$ года), ^{243}Am ($T_{1/2}=7,37$ тыс. лет) и другие. Исходя из приведённого выше в литературном обзоре состава выбросов аварии видно, что в нем присутствовали техногенные альфа-излучатели изотопы Pu и Cm. Из-за того, что они входили в состав «горячих частиц», их осаждение происходило в непосредственной близости к реактору. Вероятно, образцы почв, проанализированные нами, не содержали горячие частицы из-за относительной удаленности от реактора. Кроме того, возможно, что часть из них из-за короткого периода полураспада давно перестала давать вклад в формирование дозы ионизирующего излучения (например, ^{242}Cm ($T_{1/2}=162$ дня), ^{244}Cm ($T_{1/2}=18,1$ года). А другие, например, изотопы ^{239}Pu , хотя и присутствовали в составе выбросов и являются долгоживущими, даже в начальный период после аварии составляли вместе с продуктами своего распада незначительную долю в суммарных выбросах по сравнению с такими бета-излучателями, как ^{137}Cs и ^{90}Sr . Возможно именно по этим причинам нам

не удалось зарегистрировать ни одной альфа-частицы при проведении радиометрии образцов почв ближней зоны ЧАЭС.

Радиометрия контрольных образцов показала следующие результаты: интенсивность потока бета-излучения от поверхности всех контрольных образцов оказалась почти одинаковой для всех образцов и в среднем равна $0,07$ импульс/с*см² с погрешностью в пределах 20%. С интенсивностью гамма-излучения дело обстоит иначе, и наибольшее значение зарегистрировано у образца водопроводной воды - $0,475 \pm 0,046$ $\mu\text{Sv/h}$, что превышает наименьшее значение (перлит) в 13,6 раз. Хотя согласно ОСПОРБ 99/2011 данные значения практически не превышают норматив МЭД на местности для населения в $0,3$ $\mu\text{Sv/h}$.

При этом при сравнении интенсивности потока бета-излучения с поверхности образцов почв ближней зоны ЧАЭС и контрольных образцов можно выявить превышение первой над второй на порядки, а в случае с гамма-излучением значения дозы излучения с поверхности образцов почв ближней зоны ЧАЭС близки или даже ниже контрольных. И только интенсивность гамма-излучения от проб из посёлка Новошепеличи в 2,5-4,5 км от эпицентра - $2,65$ $\mu\text{Sv/h}$ и в 4,5-5,5 км от эпицентра - $1,51$ $\mu\text{Sv/h}$ выше таковой от контрольных образцов.

Анализ условного соотношения бета- и гамма-компоненты излучения от контрольных образцов и почв ближней зоны Чернобыльской аварии свидетельствует о том, что ионизирующее излучение от почв ближней зоны создается преимущественно бета-излучающими нуклидами - ПЯД, присутствующими в аварийном выбросе и имеющими относительно долгий период полураспада.

В целом, полученные нами данные подтверждают известные из литературы сведения о формировании полей радионуклидного загрязнения в зоне аварии. Известно, что ореолы загрязнения почв сформировались неравномерно и загрязнение можно назвать «мозаичным». Это было связано с погодными условиями и физико-химической формой выпадения радионуклидов,

присутствовавших в составе выбросов непосредственно в день аварии, в начальный период после аварии и, затем, продуктами их распада.

При этом, нами в ходе измерений не было зарегистрировано ни одной альфа-частицы, что можно объяснить малой долей представителей альфа-излучателей в составе суммарных выбросов при аварии и в составе выпадений дальней зоны аварии, коротким периодом полураспада некоторых альфа-излучателей. Кроме того, возможное объяснение связано с особенностями радиометрии насыпных образцов, когда из-за низкой проникающей способности альфа-частиц мы не фиксировали их выход из-за поглощения непосредственно в измеряемом образце почвы.

Кроме того, нам не удалось найти сведения о существовании нормативного документа, в котором были бы прописаны допустимые значения интенсивности потока бета-излучения от почвы. В существующих санитарно-гигиенических нормативных документах регламентируется только поток бета-излучений от загрязненных поверхностей для условий контролируемого облучения в производственных условиях. Поэтому существенной задачей остается оценить влияние внешнего потока β -частиц на мелкие объекты биоты (Leme, Marin-Morales, 2009) поскольку именно такая ситуация реальна в условиях загрязнения радионуклидами–продуктами деления при тесном контакте клеток с загрязненными почвами. При этом необходимо знать энергетические характеристики потока, которые зависят от радионуклидного состава загрязнений.

Был получен облученный в таких условиях биоматериал корневой меристемы *A. сера* для проведения цитогенетического анализа, для получения основных значимых для оценки воздействия излучения от загрязненных почв ближней зоны количественных показателей процесса митоза.

Глава 8. Твердофазное фитотестирование, *Allium test*

После проведение твердофазного фитотестирования, приготовления препаратов и микроскопирования в проходящем свете были получены данные о

количестве клеток, вступивших в каждую фазу митоза, рассчитан митотический индекс и его доверительный интервал (Таблица 6), а также соответствующие фазные индексы (Таблица 7).

Таблица 6. Митотический индекс и доверительный интервал доли для исследованных образцов.

Код	Образец	Расстояние от ЭЦ	N	MI, %	Доверительный интервал доли
0.-4.	Контроль	-	1159	16.3	(14.2÷18.5)
7.-4.	Новошепеличи	2.5-4.5	971	8.1	(6.5÷9.9)
6.-4.	Новошепеличи	4.5-5.5	632	11.9	(9.45÷14.5)
5.-4.	Новошепеличи	5.5-9.5	587	6.3	(4.5÷8.4)
4.-4.	Новошепеличи	9.5-14.5	907	11.7	(9.7÷13.9)
3.-4.	Копачи	1-4	1700	8.1	(6.85÷9.45)
2.-4.	Дитятки	6-7	1510	10.7	(9.2÷12.3)

Таблица 7. Цитогенетические показатели почв ближней зоны ЧАЭС и контрольного образца.

Образец	Расстояние от ЭЦ	N	П+А+М+Т	MI, %	ПИ, %	АИ, %	МИ, %	ТИ, %
Контроль	-	1159	72+52+32+33	16.3	38.1	27.5	16.9	17.5
Новошепеличи	2.5-4.5	971	27+25+16+11	8.1	34.2	31.6	20.3	13.9
Новошепеличи	4.5-5.5	632	34+24+6+11	11.9	45.3	32.0	8.0	14.7
Новошепеличи	5.5-9.5	587	19+9+3+6	6.3	51.4	24.3	8.1	16.2
Новошепеличи	9.5-14.5	907	31+22+15+38	11.7	29.2	20.8	14.2	35.8
Копачи	1-4	1700	48+50+14+26	8.1	34.8	36.2	10.1	18.8
Дитятки	6-7	1510	65+52+20+25	10.7	40.1	32.1	12.3	15.4

На основании статистики Т-критерий Стьюдента была установлена достоверность различий между полученными значениями митотического индекса и значением митотического индекса контрольного образца с уровнем

значимости $\alpha=0.05$. Проверка гипотез о различиях в результатах и их доказательство представлены в Таблице 8.

Таблица 8. Проверка гипотезы о статистическом различии значений митотического индекса контрольного и изучаемых образцов.

Образец	N	MI, %	t	
Контроль	1159	16.3		Сравнение трассчет с $t_{кр}=1.96$
Новошепеличи	971	8.1	5.81	H1: принимается, различия достоверны с $\alpha=0.05$
Новошепеличи	632	11.9	2.59	H1: принимается, различия достоверны с $\alpha=0.05$
Новошепеличи	587	6.3	6.39	H1: принимается, различия достоверны с $\alpha=0.05$
Новошепеличи	907	11.7	3.01	H1: принимается, различия достоверны с $\alpha=0.05$
Копачи	1700	8.1	6.66	H1: принимается, различия достоверны с $\alpha=0.05$
Дитятки	1510	10.7	4.20	H1: принимается, различия достоверны с $\alpha=0.05$

Из Таблицы 8 видно, что значение митотического индекса всех изученных образцов достоверно отлично от значения митотического индекса контрольного образца с уровнем значимости $\alpha=0.05$.

Далее была проведена проверка гипотезы о попарных различиях митотических индексов между собой и анализ изменения величины митотического индекса с расстоянием.

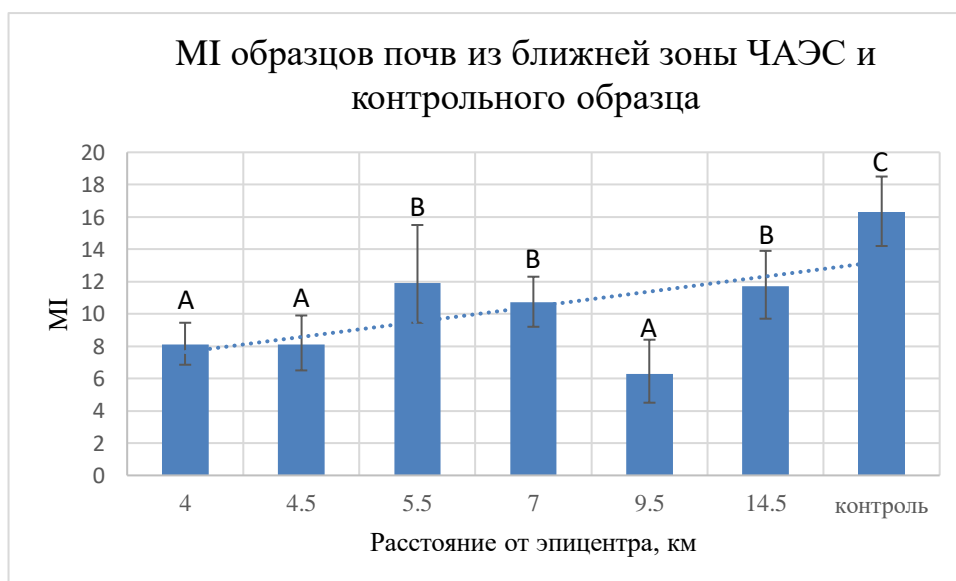


Рисунок 4. Величины митотических индексов почв из ближней зоны ЧАЭС и контрольного образца. Варианты, в обозначении которых не присутствует одна и та же буква, значительно различаются. Планка погрешности-стандарт.

Таким образом МІ образцов почв, отобранных в 4, 4.5 и 9.5 км от источника не имеют статистических различий между собой, но значительно отличаются от МІ образцов почв, отобранных в 5.5, 7 и 14.5 км от эпицентра аварии. МІ контроля достоверно отличен от остальных. Митотический индекс по мере удаления от эпицентра аварии имеет выраженный тренд на увеличение. Значение митотического индекса, соответствующее 9.5 км, является минимальным. В целом справедливо утверждение о том, что по мере удаления от эпицентра аварии МІ достоверно возрастает, а значит, с расстоянием увеличивается число клеток, вступивших в митоз.

Далее был проведён анализ изменения цитогенетических показателей с увеличением интенсивности γ -излучения и β -излучения. Данные представлены на диаграммах ниже.

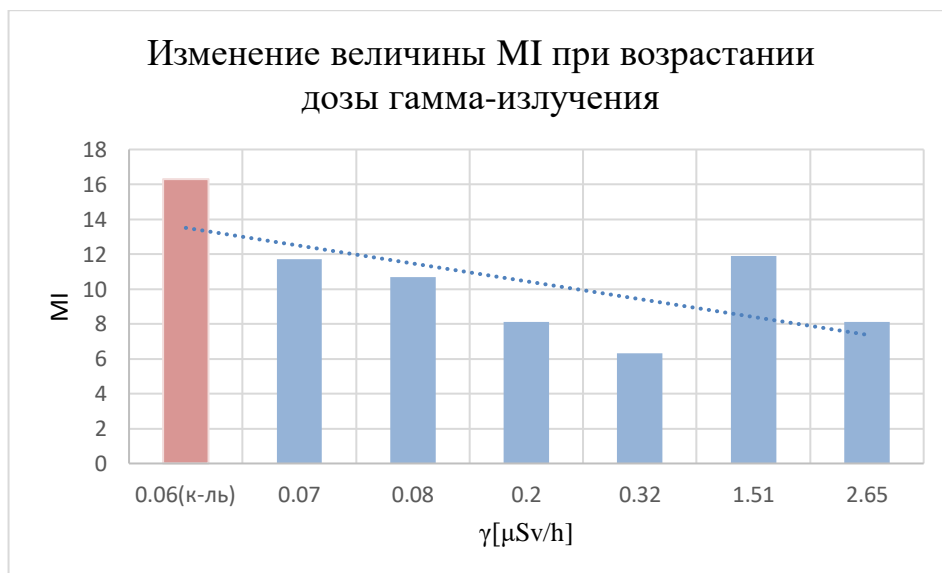


Рисунок 5. Изменение величины митотического индекса при возрастании дозы гамма-излучения.

С возрастанием интенсивности гамма-излучения наблюдается тренд на уменьшение величины митотического индекса, причём индекс митотической

активности явно уменьшается до значения, соответствующего величине дозы гамма-излучения, равной $1.51 \text{ } \gamma[\mu\text{Sv/h}]$, где он оказывается почти равным значению, соответствующему $0.07 \text{ } \gamma[\mu\text{Sv/h}]$, а затем снова снижается. За исключением контрольного значения МІ, индексы, соответствующие 0.07 и $1.51 \text{ } \gamma[\mu\text{Sv/h}]$ имеют наибольшие значения и соответствуют 14.5 и 5.5 км от источника выброса. Контрольное значение МІ оказывается максимальным в полученном ряду данных. Значение МІ, соответствующее $0.32 \text{ } \gamma[\mu\text{Sv/h}]$ -интенсивности гамма-излучения, зафиксированной от пробы, отобранной в 9.5 км от эпицентра аварии, является минимальным.

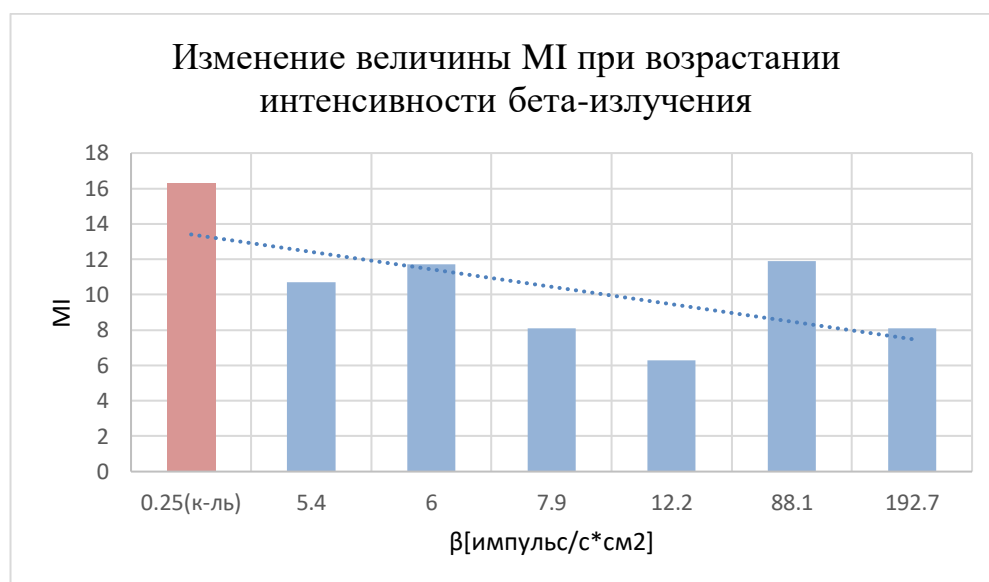


Рисунок 6. Изменение величины митотического индекса при возрастании интенсивности бета-излучения.

С увеличением числа импульсов бета-излучения тренд на уменьшение величины митотического индекса становится менее выраженным, чем в случае с расстоянием и гамма-излучением, но всё же некоторое уменьшение митотического индекса можно отметить. Контрольное значение митотического индекса, как и в случаях, описанных выше, является максимальным в представленном ряду данных. За ним по величине следуют значения

митотического индекса, зафиксированные при 88.1 и 6 [импульс/с*см²], соответствующие 5.5 и 14.5 км. Минимальное значение митотического индекса зафиксировано при 12.2 [импульс/с*см²]-на расстоянии 9.5 км от источника выброса.

На основании зависимостей, описанных выше, можно сказать, что минимальное значение митотического индекса во всех трёх случаях фиксировалось на расстоянии 9.5 км от эпицентра аварии, а максимальное (за исключением контроля) и достоверно неотличное от него значение митотического индекса -на расстоянии, соответственно, 5.5 и 14.5 км. При этом контрольное значение МІ достоверно отлично от всех полученных значений и является истинно максимальным. Таким образом митотическая деятельность была наиболее угнетённой не в непосредственной близости от источника выброса, а на некотором удалении от него.

Тренд на увеличение МІ с расстоянием и уменьшением дозы гамма-излучения оказался более выраженным тренда на увеличение МІ с уменьшением дозы бета-излучения. Можно предположить, что это связано с особенностями энергетического спектра последнего. Измеренные нами значения соответствуют количеству распадов в секунду на единицу площади, а энергия электрона от каждого распада оказывается разделена между электроном и антинейтрино. В итоге мы не знаем точно, какая часть энергии пришлась на бета-частицу. Возможно, именно поэтому зависимость между увеличением дозы бета-излучения и уменьшением МІ не такая чёткая. В случае с гамма-излучением измерялась непосредственно доза такового, возможно, поэтому зависимость оказалась более чёткой. Для уточнения этой гипотезы и получения более точных зависимостей необходимо в перспективе оценить дозу бета-излучения.

Глава 9. Анализ взаимосвязей показателей

Для понимания причин митотоксичности (снижения митотического индекса) в облученных клетках нами проанализирована сопряженность цитогенетических показателей. Мы попытались ответить на вопрос: связано ли изменение митотического индекса с изменением продолжительности фаз митоза и изменением факторов излучения в ряду протестированных почв?

9.1. Анализ изменения фазных индексов с расстоянием

После непосредственного расчёта фазных индексов был проведён анализ их изменения с расстоянием, увеличением дозы β - и γ -излучения.

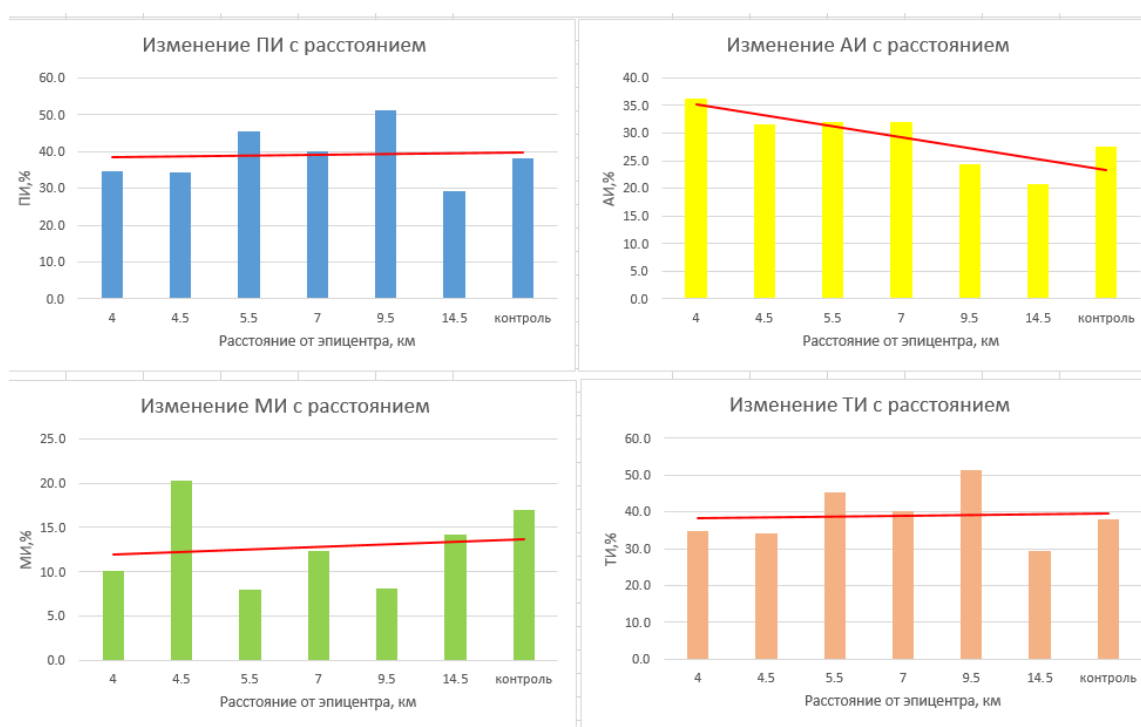


Рисунок 7. Изменение фазных индексов с расстоянием

Наибольшие различия фазных индексов с контролем наблюдаются для анафазного индекса. Анафазный индекс значительно уменьшается по мере удаления от эпицентра аварии, причем его значение в непосредственной близости от эпицентра выше контрольного значения, в отличие от других индексов. Другими словами, вблизи эпицентра аварии происходит задержка деления в анафазу, которая уменьшается по мере удаления от него.

Для профазного, метафазного и телофазного индексов в общем есть небольшой тренд на увеличение с расстоянием от эпицентра, но в целом значения индексов в точках отбора довольно сильно варьируют, причем для профазного и телофазного индексов значения индексов в самой ближней точке от источника выброса почти идентичны контрольным, а максимумы приходятся на 9.5 км от эпицентра аварии. Заметим также, что вблизи эпицентра аварии наблюдается некоторая задержка деления клеток в профазу.

Значения метафазного индекса во всех точках опробывания оказались ниже контрольного значения. Исключением оказался образец, отобранный в 4.5 км от эпицентра аварии. Его метафазный индекс выше контрольного, а значит, там происходит задержка деления в метафазу.

9.2. Анализ изменения фазных индексов с увеличением дозы гамма-излучения

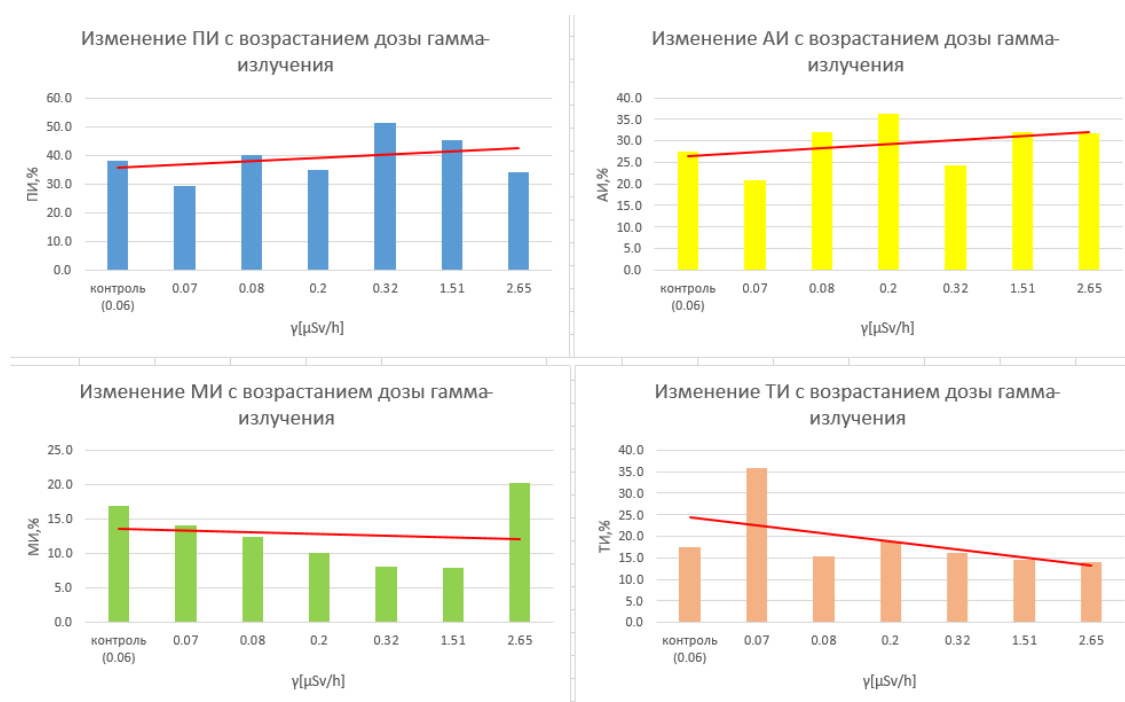


Рисунок 8. Изменение фазных индексов с возрастанием дозы гамма-излучения.

При возрастании дозы гамма-излучения можно увидеть некоторый тренд на увеличение профазного и анафазного индексов. При этом значение

профазного индекса при максимально зарегистрированной дозе гамма-излучения немногим меньше контрольного значения.

В случае с метафазным и телофазным индексом картина иная: значение метафазного индекса с увеличением дозы гамма-излучения уменьшается и лишь при максимально зафиксированной дозе облучения резко возрастает и оказывается максимальным.

Значение телофазного индекса, в отличие от остальных фазных индексов, имеет тренд на уменьшение с возрастанием дозы гамма-излучения, причём данный индекс при минимальной дозе облучения много больше, чем при больших зафиксированных дозах. Все полученные значения телофазного индекса, за исключением максимального, сопоставимы с контрольным.

9.3. Анализ изменения фазных индексов с увеличением интенсивности бета-излучения

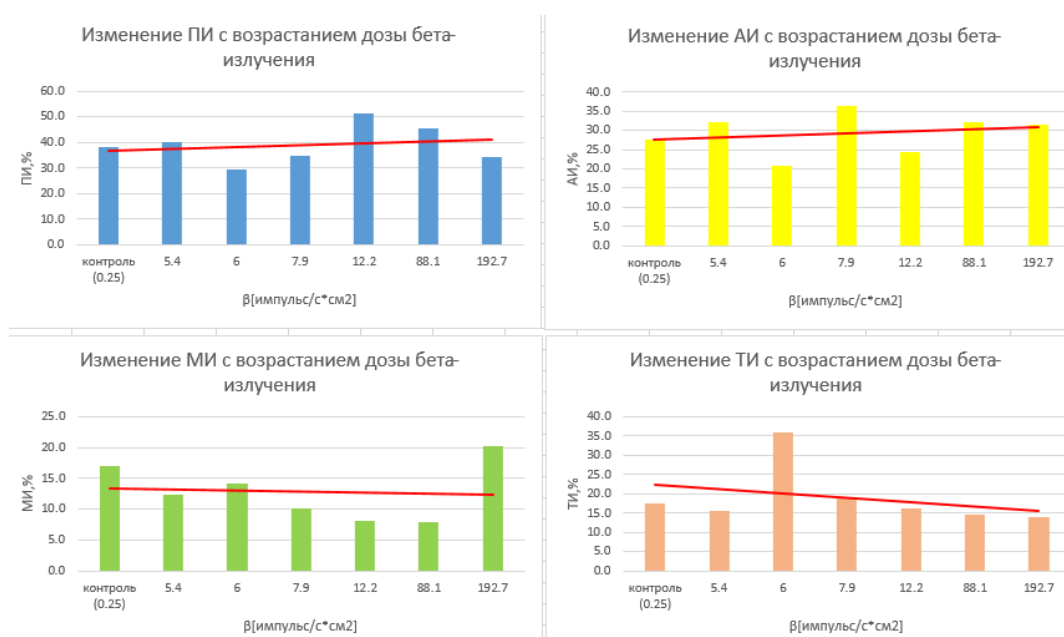


Рисунок 9. Изменение фазных индексов с возрастанием интенсивности бета-излучения

Распределение значений профазного индекса по значениям интенсивности бета-излучения, ранжированных по возрастанию, неравномерно, максимальное значение индекса приходится на 12.2 импульсов/с*см². Значение профазного

индекса, соответствующее максимальному числу импульсов, немногим меньше контрольного.

Значение анафазного индекса при минимально зафиксированном значении интенсивности бета-излучения примерно равно значению анафазного индекса при максимально зафиксированном числе импульсов такового и оказывается выше значения анафазного индекса контрольного образца.

Метафазный индекс, как и в случае гамма-излучения, снижается вплоть до максимально зафиксированного значения интенсивности бета-излучения, в котором соответствующее значение индекса максимально и превышает даже значение метафазного индекса контрольного образца.

Максимальное значение телофазного индекса соответствует 6 импульсам/с*см², а значение индекса при минимально зафиксированном значении числа импульсов бета-излучения сопоставимо со значением индекса при максимально зафиксированном значении такового и значением телофазного индекса контрольного образца.

Особенно интересно, что задержка деления в профазу митоза (максимальное значение профазного индекса) выявлена во всех трёх случаях на расстоянии 9.5 км от источника выброса и соответствует минимальному значению митотического индекса.

В целом, при объединении в единый анализируемый массив цитогенетических данных выявлено, что закономерности изменения фазных индексов не соответствуют трендам изменения как митотического индекса, так и характеристикам ионизирующих излучений.

Для оценки статистической значимости обнаруженных видимых зависимостей был проведен расчет ранговой статистики Спирмена. Результаты представлены в таблице.

Таблица 9. Значения коэффициентов корреляции Спирмена между тестовыми цитогенетическими характеристиками митоза в клетках корневой меристема *A. сера* и показателями радиометрии почвенных образцов из ближней зоны (**выделены** значимые на уровне $p < 0,05$ ранговые корреляции, отмечены * - значимые на уровне $p < 0,10$ ранговые корреляции, N – объем корреляционного ряда)

Показатели	Расстояние, км	γ [μ Sv/h]	β [импульс/с*см ²]	МИ,%	ПИ,%	МИ,%	АИ,%	ТИ,%
N=6								
Расстояние, км		-0,54	-0,43	0,17	0,03	-0,77	0,03	0,43
N=7								
γ [μ Sv/h]			0,96	-0,52	0,21	0,25	-0,25	-0,75*
β [импульс/с*см ²]		0,96		-0,48	0,07	0,07	-0,21	-0,61
МИ,%		-0,52	-0,49		-0,13	-0,09	0,14	0,13
ПИ,%		0,21	0,07	-0,13		0,14	-0,71*	-0,36
МИ,%		0,25	0,07	-0,09	0,14		-0,25	-0,29
АИ,%		-0,25	-0,21	0,14	-0,71*	-0,25		0,0
ТИ,%		-0,75*	-0,61	0,13	-0,36	-0,29	0,0	

Как видно из представленных данных, значимые прямые взаимосвязи отмечены между гамма- и бета компонентами потока ионизирующих излучений от почв. И с меньшим уровнем значимости выявлены обратные взаимосвязи между величиной гамма-составляющей и величиной телофазного индекса, а также парой профаза- анафаза индексы.

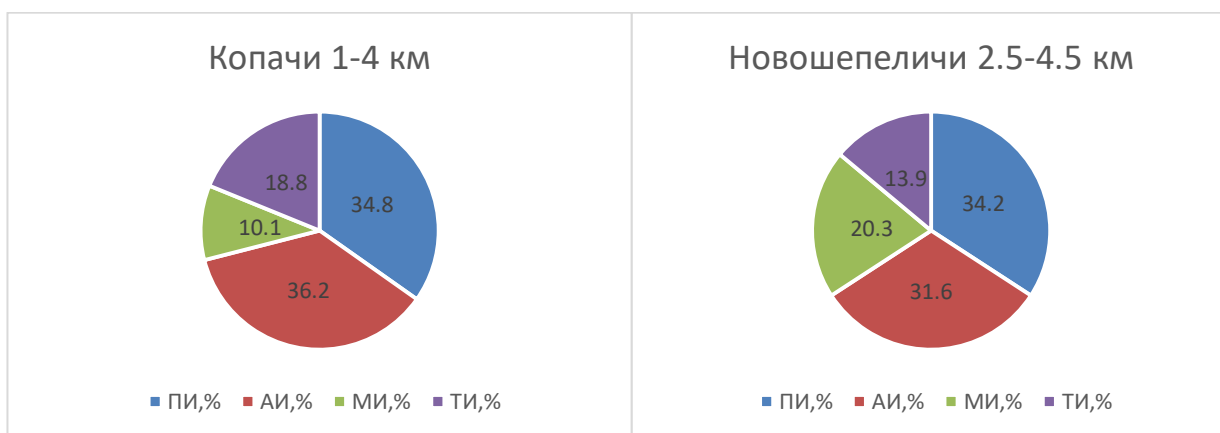
Итак, объединение в единый корреляционный ряд экспериментальных данных для образцов почв, отобранных на различных участках ближней зоны, не позволило статистически доказать значимость визуально выявляемых трендов сопряженного изменения митотического индекса и характеристик излучений.

Вероятно, это связано с тем, что взаимосвязи с радиотоксичностью оценивались в многофакторной системе «загрязненные радионуклидами чернобыльского выброса почвы ближней зоны». Состав и свойства почв, а также спектр техногенных радионуклидов различен (что доказано варьирующим соотношением бета- и гамма компоненты) и эти факторы могут влиять на

процесс митоза. При этом основной показатель – митотический индекс – зависит от проявления различных цитотоксических и генотоксических эффектов, механизмы которых обусловлены нарушениями в различных клеточных структурах и процессах. Это не позволило статистически значимо выявить взаимосвязи его изменения только с дозовыми и потоковыми характеристиками излучения от почв из различных мест пробоотбора.

Аналогичным образом, анализ сопряженных цитогенетических показателей, связывающих изменение митотического индекса с изменением продолжительности фаз митоза для понимания причин митотоксичности, не позволил отметить единого тренда. Значимая взаимосвязь не выявлена, что может свидетельствовать о различных причинах на разном расстоянии от эпицентра аварии эффекта митотоксичности (снижения митотического индекса) в индивидуальных образцах почв.

Поэтому был проведен анализ соотношения фазных индексов в индивидуальных образцах и их сравнение с контрольными значениями. Данные представлены на рисунке 10.



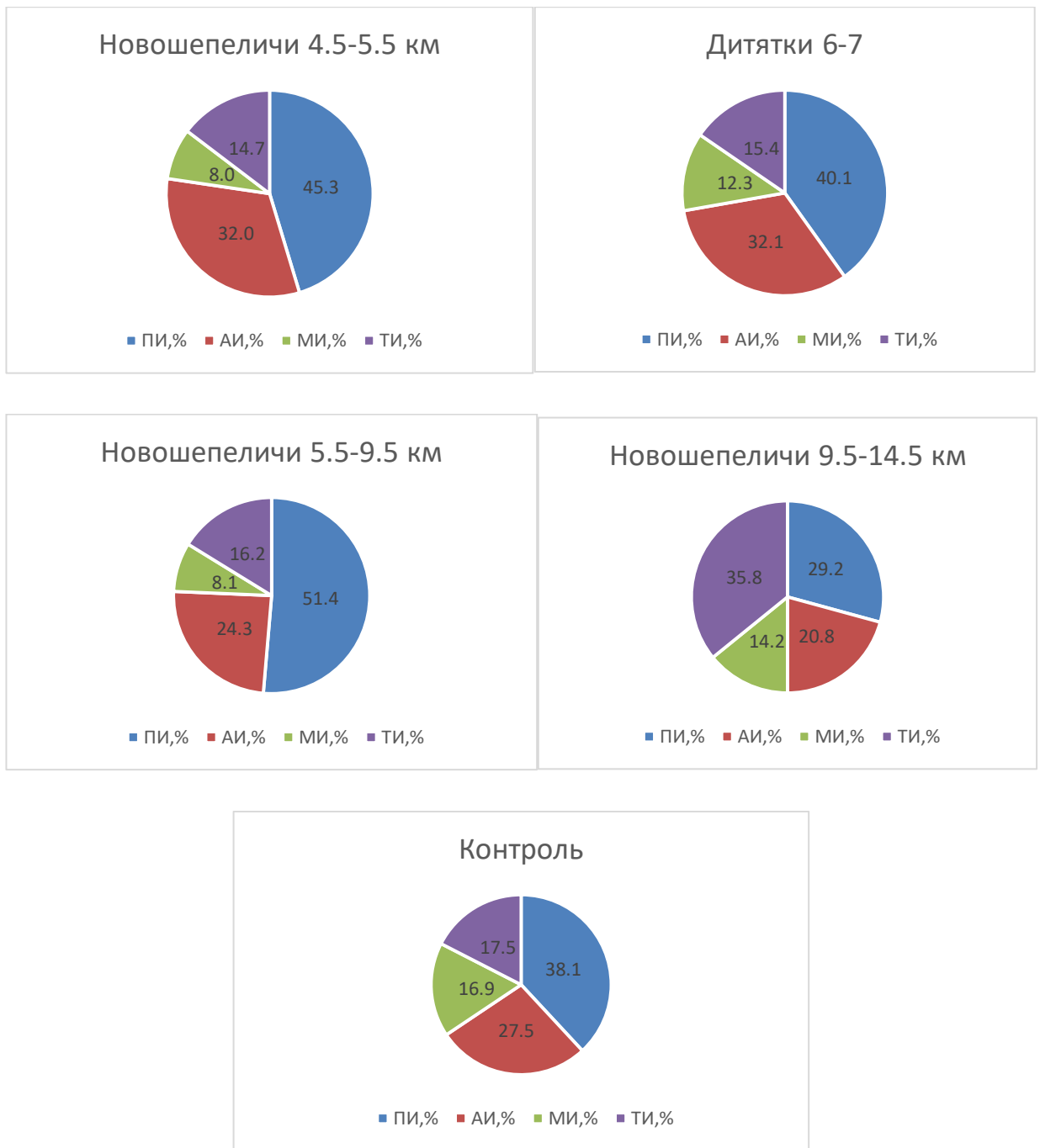


Рисунок 10. Круговые диаграммы процентного соотношения клеток, вступивших в каждую фазу митоза на разном расстоянии от эпицентра аварии.

Сравнение соотношения продолжительности фаз митоза в индивидуальных тестовых образцах выявляют наибольшее отличие от контроля для образцов направления отбора Новошепеличи: 1) с расстояния 9,5 км - с увеличением доли профазных клеток и 2) образца с расстояния 14,5 км - с увеличением доли телофазных клеток.

Задержка деления в профазу может быть вызвана так называемым первичным эффектом облучения (Sax, 1941), который приводит к слипанию и частичному слиянию хромосом и временному торможению клеточного деления. При более высоких дозах деление подавляется на один-два дня. При более низких дозах наблюдается незначительное замедление митотической активности, но комкование и слияние хромосом обнаруживается в течение нескольких часов после облучения.

Также задержка деления в профазу может быть вызвана угнетением киназного комплекса циклин В/CDK1, который «запускает» митоз в клетке: клетка вступает в процесс деления при фосфорилировании одних белков и дефосфорилировании других. Эти процессы обеспечивают ферменты киназы (Кононенко И ДР., 2019) и фосфатазы. Как известно, под действием облучения происходит денатурация белка, а значит и задержка деления в профазу, регулируемую белковыми комплексами. Более того активированный белковый комплекс фосфорилирует многие ядерные белки, включая те, которые обеспечивают целостность ядерной оболочки. При правильной работе комплекса эти белки теряют связь с мембраной ядра, вызывают его набухание и разрыв окружающей его оболочки. При нарушении этого процесса не происходит разрыва ядерной оболочки и откладывается стадия метафазы.

Большое значение метафазного индекса вблизи источника выброса может быть связано с нарушениями в работе веретена деления под действием ионизирующего излучения. По К. Саксу (1941) первичный эффект ионизирующего излучения проявляется в метафазе менее чем через час после облучения. Хромосомы более тесно связаны на метафазной пластинке и, по-видимому, более сжаты, что при облучении мешает им начать расходиться с наступлением анафазы. Задержка митоза в метафазу по современным представлениям связана с повреждениями веретена деления, препятствующими метакинезу (отставания хромосом в процессе метакинеза) или затрудняющими переход в анафазу (к-митоз).

Задержка деления в анафазу может быть связана с нарушением функционирования веретена деления или «увеличенным» лаг-периодом после прикрепления к веретену деления последнего кинетохора и до начала расхождения хроматид: в этот период деградируют некоторые белки, а расхождение хроматид к полюсам обеспечивается за счёт активности кинетохора и текучести субъединиц микротрубочек. Также возможная причина – нарушение процессов цитотомии и затруднение перехода в телофазу.

Более четкое выяснения причин митотоксичности по изменению продолжительности фаз митоза можно осуществить по анализу частот спектра патологий митоза и особенно частот видов хромосомных аберраций. Данный анализ будет сделан в ходе дальнейших исследований.

Обобщая известные из литературы данные, можно отметить возможные механизмы митотоксичности по анализу величин фазных индексов. Задержка деления в профазу митоза может быть связана с изменением поверхности и последующим слипанием хромосом, в метафазу - с повреждениями веретена деления на этапе метакинеза или начала расхождения хромосом к полюсам, что затрудняет переход в анафазу, в анафазу - с нарушениями функционирования веретена деления и процессов цитотомии и затруднением перехода в телофазу.

Выводы

1) Проведена процедура твердофазного тестирования клеток корневой меристемы *A. сера* в условиях, имитирующих ситуацию облучения от загрязненных радионуклидами Чернобыльского выброса почв в отдаленный период времени после аварии.

2) Радиометрия тестируемых образцов, отобранных 1998 году в ближней зоне ЧАЭС (до 14, 5 км от эпицентра) в направлении поселков Копачи, Новошепеличи и Дитятки не выявила четкой зависимости интенсивности излучения от расстояния до реактора. Интенсивность потока ионизирующего излучения в

непосредственной близости от поверхности насыпного образца характеризовалась величинами: гамма-компоненты в диапазоне значений мощности эквивалентной дозы $0,07 \div 2,65$ мкЗв/час, бета-компоненты в диапазоне значений плотности потока частиц $6,0 \div 192,7$ импульса/с*см², альфа-частиц не выявлено.

3) Анализ условных соотношений между бета- и гамма-компонентами показал, что ионизирующее излучение от почвенных образцов ближней зоны характеризуется варьирующим спектром и большой удельный вес в потоке имеет бета-составляющая, что характерно для смеси ПЯД. Соотношение $\beta : \gamma$ в исследуемых образцах ближней зоны характеризуется диапазонами значений от 85:1 до 38:1, для контрольных образцов - от 0,16:1 до 1,71:1.

4) Для характеристики радиотоксичности почв ближней зоны аварии измерены показатели процесса митоза в клетках биотестера *A. cerea* при контактном облучении меристемы – митотический и фазные индексы. Величина митотического индекса MI статистически значимо ($\alpha=0.05$) снижается до значений $6,3 \div 11,9$ % по сравнению с контрольным уровнем пролиферации в 16,3 %.

5) Статистический анализ взаимосвязей между характеристиками ионизирующих излучений от почв и цитогенетическими показателями митоза в облученных клетках не выявил статистически значимых зависимостей при объединении в единый корреляционный ряд всех исследованных образцов. Анализ визуальных трендов и величины коэффициентов Спирмена позволил ранжировать факторы и построить следующий убывающий ряд по тесноте обратной связи с величиной митотического индекса: мощность дозы гамма-излучения > плотность потока бета-частиц > расстояние от эпицентра аварии.

6) Митотическая активность клеток меристемы *A. cerea* оказалась наиболее угнетённой в биотесте с образцом почвы, отобранном по направлению Новошепеличи не в непосредственной близости от эпицентра аварии, а на

расстоянии 9,5 км. Минимальному значению митотического индекса соответствует задержка деления в профазу (максимальное значение профазного индекса), что может быть связано с радиотоксическим эффектом изменения поверхности и слипанием хромосом на начальных стадиях митоза.

Список литературы

1. Алесахин Р.М. Крупные радиационные аварии: последствия и защитные меры/ Алесахин Р.М., Булдаков Л.А., Губанов В.А. и др. Под общей ред. Ильина Л.А. и Губанова В.А.-М.:ИздАТ, 2001.-752 с.
2. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза: Учебное пособие/ Алов И.А.- М.: Медицина, 1972. - 264 с.
3. Авария на Чернобыльской АЭС и ее последствия / Информация, подготовленная для совещания экспертов МАГАТЭ (25-29 августа 1986 г., Вена). М., ГКАЭ СССР, 1986.
4. Багдасарян А. С. Чувствительность *Allium cepa* (L.) к загрязнённости почвенного покрова // Фундаментальные исследования. 2004. № 3. С. 94.
5. Калаев В.Н. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма: Учебное пособие/ Калаев В.Н., Карпова С.С.- Воронеж: ВГУ, 2004. – 80 с.
6. Кононенко И. Б., Снеговой А. В., Сельчук В. Ю. Ингибиторы циклин-зависимых киназ: эффективность и безопасность // Медицинский совет №10, 2019, С.42-55
7. Наследие Чернобыля: медицинские, экологические и социально-экономические последствия и рекомендации правительствам Беларуси, Российской Федерации и Украины. Чернобыльский форум 2003-2005, 2-е исправленное издание/
https://www.who.int/ionizing_radiation/chernobyl/chernobyl_digest_report_RUS.pdf
8. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений: Учебное пособие/ Паушева З.П.-М.: Агропромиздат, 1988.- 271 с.

9. Песня Д. С., Романовский А. В., Прохорова И. М. Исследование токсического и генотоксических эффектов синтетических пищевых красителей методом *Allium test* // Ярославский педагогический вестник. 2012. Т. 3. № 3. С. 86-93
10. Песня Д. С., Романовский А. В., Прохорова И. М. Разработка методики для оценки влияния УВЧ-излучения сотовых телефонов и других приборов с ЭМИ РЧ на организмы *in vivo* // Ярославский педагогический вестник. 2010. Т.6 №3. С. 80-84
11. Столбова В.В., Агапкина Г.И., Котельникова А.Д., Догадова А.В., Абалымова А.А. Краткосрочный метод оценки генотоксичности почвы как твердофазного тела на базе *Allium*-теста // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. 2018. № 5, с. 24-30
12. Столбова В.В., Мамихин С.В., Котельникова А.Д., Прохорова С.А., Зайцева М.В. Детализация классификации аббераций хромосом с недифференцированным окрашиванием для учёта кластогенного воздействия радионуклидных и комплексных загрязнений // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т.59 №5. С. 465-474
13. Фель В.Я. Нарушения цитодифференцировки при магнизации и проблема иммунного надзора/ Фель В.Я.; АН СССР, Ин-т цитологии. - Ленинград: Наука. Ленингр. отд-ние, 1977. - 184 с.
14. Шереметьева А.С., Жук А.А., Переверзева Я.О., Хомякова У.А. Исследование влияния диоксида на митотическую активность корней *Allium* сера // Бюллетень медицинских интернет-конференций. Т8. Фундаментальная медицина. 2018. №1
15. Amiro B.D. Radiological dose conversion factors for generic non-human biota used for screening potential ecological impacts // J. environmental radioactivity. 1997. Vol.35.N.1. P.37-51
16. Fleishman D.G., Mikiforov V.A., Saulus A.A. et al. ¹³⁷Cs in fish of some lakes and rivers of Bryansk region and North-West Russia in 1990-1992 // J. Environmental Radioactivity. 1994. Vol.24. N 2. P.145-158

17. Jones D., Domotor S., Higley K., Kocher D., Bilyard G. Principles and issues in radiological ecological risk assessment // J. environmental radioactivity 66 (2003) P.19-39
18. Karl Sax The behavior of X-ray induced chromosomal aberrations in allium root tip cells // Genetics 26: 418 (1941) P. 418-419
19. Leme D., Marin-Morales M. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // Mutation research 682 (2009) P. 71-81
20. Moore M Charleen, Best G Robert Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations // Encyclopedia of life sciences, nature publishing group, 2001
21. Salbu B. Challenges in radioecology // J. environmental radioactivity 100 (2009) P.1086-1091
22. Tedesco S.B., Haywood Dail Laughinghouse IV Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test // Environmental Contamination 2012
23. Ulsh B., Hinton T.G., Congdon J.D., Dugan L.C., Whicker F.W., Bedford J.S. Environmental dosimetry: a biologically relevant tool for ecological risk assessment and biomonitoring // J. environmental radioactivity 66 (2003) P. 121-139
24. Zaitsev A.S., Gongalsky K.B., Nakamori Taizo, Kaneko Nobuhiro Ionizing radiating effects on soil biota: Application of lessons learned from Chernobyl accident for radioecological monitoring // Pedobiologia 57 (2014) P. 5-14