



УДК 593.163.574.5/6(262.4)

В. Г. Цицугина¹, канд. бiol. наук, вед. науч. сотр., Х. Флору², докт. философии, ст. исследователь,
Г. Г. Поликарпов¹, акад. НАН Украины, гл. науч. сотр.

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАНУ, Севастополь, Украина,

²Национальный центр научных исследований «Демокритос», Афины, Греция

МУЛЬТИАБЕРРАНТНЫЕ КЛЕТКИ И ПИКНОЗ ЯДЕР У ГИДРОБИОНТОВ ИЗ РАЙОНА С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЕСТЕСТВЕННЫХ РАДИОНУКЛИДОВ

Исследованы аберрации хромосом в клетках гидробионтов на о. Икария в Эгейском море, где вблизи гидротермальных источников наблюдается повышенное содержание естественных радионуклидов. У ракообразных и червей в этих районах обнаружены наиболее высокий уровень хромосомного мутагенеза, мультиаберрантные клетки и пикноз ядер. Предполагается, что генотоксические эффекты индуцированы комплексным влиянием низкой величины pH, высокой температуры воды и повышенного содержания естественных радионуклидов.

Ключевые слова: Эгейское море, о. Икария, естественные радионуклиды, гидробионты, аберрации хромосом, пикноз ядер

Участки биосферы с повышенным содержанием естественных радионуклидов представляют большой интерес для изучения хронического действия малых доз ионизирующей радиации на живые организмы. Такие районы известны в России, Бразилии, Индии, Франции, Италии, Австрии. В исследованиях, проведенных на популяциях наземных животных и растений, обитающих в местах с повышенным уровнем естественной радиоактивности, обнаружены, в основном, повреждающие эффекты, а также, в некоторых случаях, увеличение радиорезистентности при провокационном облучении [1, 3, 4, 8, 10 - 12, 14].

Цель нашей работы – изучение генотоксических эффектов в популяциях гидробионтов на греческом острове Икария в восточной части Эгейского моря. На этом острове вулканического происхождения имеется несколько гидротермальных источников, вода которых, а также почва, морская вода, донные

отложения и живые организмы вблизи выхода этих источников характеризуются повышенным содержанием естественных радионуклидов. В почве и донных отложениях максимальная концентрация ²³⁸U составляет 1050 Бк/кг, ²²⁶Ra – 760 Бк/кг, ²²⁸Ra – 260 Бк/кг, ²³²Th – 70 Бк/кг, ⁴⁰K – 2500 Бк/кг. Отмечены также повышенные концентрации ²²²Rn (114 – 2460 Бк/л в воде источников и 1.3 – 35 Бк/л в прибрежной морской воде) [16].

Материал и методы. Отбор проб гидробионтов был проведен в июле 2002 и 2003 гг. в юго-восточной части острова, в Эгейском море, в районах гидротермальных источников (Терма и Лефкада), а также, для сравнения, в маленьком пресноводном водоеме, образованном непосредственно гидротермальным источником в горах в южной части острова. Пробы собирали, промывая в ведре с водой водоросли и камни, взятые вблизи уреза воды. Смывы фильтровали через мельничный газ № 12. Для

контроля пробы были собраны таким же способом на противоположной стороне острова в Эгейском море (Арменистис и Фанари) с нормальным естественным радиационным фоном. Температура воды в районе Термы была 26°C, в районе Лефкады – 35°C, в районе Арменистис – 27°C, в районе Фанари – 33°C, в пресноводном водоеме – 33°C. Во всех случаях материал фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). В морских пробах с о. Икария для исследования были выбраны ракообразные *Melita palmata* Montagu, 1804 (Gammaridae, Amphipoda) и черви *Platynereis dumerilii* Audouin et M.-Edwards, 1834 (Nereidae, Polychaeta), а также молодые особи (длиной 5 - 6 мм) полихеты *Lycastopsis* sp. Augener, 1922 (Nereidae). В пресноводном водоеме исследовали червей *Nais communis* Piguet, 1906 (Oligochaeta).

Для цитогенетического анализа эмбрионов раков *M. palmata* на стадии поздней гаструллы извлекали изmarsupиальных сумок самок, окрашивали 1% ацетоорсенином и готовили давленые препараты в 60% молочной кислоте. Исследовали по 3 – 4 эмбриона от каждой из 5 – 6 самок. Учет aberrаций хромосом проводили на стадиях анафазы и телофазы митоза. Червей окрашивали, измельчали и гото-

вили давленые препараты аналогичным способом. На давленых препаратах червей *Lycastopsis* sp. имелись клетки на разных стадиях митоза и мейоза. Среди митотически делящихся клеток были как развивающиеся половые клетки, так и соматические, обеспечивающие рост молодых особей. Анализ aberrаций хромосом проводили во всех митотически делящихся клетках на стадии анафазы-телофазы, а также в мейотических клетках на стадии анафазы I. У ювенильных *P. dumerilii* aberrации хромосом анализировали в анафазе-телофазе митоза. У *N. communis* aberrации хромосом исследовали в соматических клетках паратомически делящихся особей на стадиях анафазы – телофазы митоза.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены результаты цитогенетического анализа гидробионтов. Можно видеть, что наибольшее количество клеток с aberrациями хромосом имеют гидробионты из районов Лефкады, Термы и в пресноводном водоеме. У ракообразных и червей в районах Арменистис и Фанари число клеток с aberrациями не выходит за пределы спонтанного уровня, который, по нашим данным [17], не превышает 2 %, независимо от таксономической принадлежности гидробионтов.

Табл. 1. Частота клеток с aberrациями хромосом у гидробионтов на о. Икария

Table 1. Frequency of cells with chromosome aberrations in aquatic organisms from Ikaria Island

Вид	Местообитание	Число исследованных особей	Число исследованных ана-тelo-фаз	Число клеток с aberrациями хромосом, %
<i>Melita palmata</i>	Арменистис	15	760	1.5 ± 0.6
<i>Melita palmata</i>	Фанари	20	961	1.7 ± 0.3
<i>Melita palmata</i>	Терма	18	952	3.8 ± 0.4**
<i>Lycastopsis</i> sp.	Терма	16	418	3.3 ± 1.4
<i>Platynereis dumerilii</i>	Арменистис	13	220	1.2 ± 0.9
<i>Platynereis dumerilii</i>	Лефкада	19	341	4.4 ± 1.2*
<i>Nais communis</i>	Пресноводный водоем	23	150	8.2 ± 3.3

* p < 0,05 в χ^2 -тесте; ** p < 0,01 в χ^2 -тесте

По данным гамма-радиометрии [16], мощности доз внешнего гамма-излучения на о. Икария лежат в диапазоне 0,05 – 0,21 $\mu\text{Гр}/\text{ч}$,

причем наиболее высокие мощности доз отмечаются вблизи гидротермальных источников. Так, в донных отложениях пресноводного во-

доема мощность дозы составляла 1,08 $\mu\text{Гр}/\text{ч}$. В остальных районах острова они соизмеримы с таковыми в других районах Греции (в среднем 0,08 $\mu\text{Гр}/\text{ч}$). Рассчитанные на основе концентраций естественных радионуклидов в почве и донных отложениях наибольшие мощности доз радиации гамма-излучения на о. Икария в районах гидротермальных источников [16] находятся, согласно концептуальной модели зависимости мощностей доз и наблюдаемых эффектов на клеточном, организменном, популяционном и экосистемном уровнях [13], близко к нижней границе зоны физиологической маскировки, где возможны функциональные и морфологические нарушения и повышенная восприимчивость к болезням. Однако мощности доз внутреннего альфа-излучения могут быть значительно больше. Возможно и генотоксическое влияние естественных радионуклидов как тяжелых металлов при их накоплении в организме.

В связи с изложенным необходимо отметить, что у гидробионтов из районов Термы, Лефкады и в пресноводном водоеме нами об-

наружены мультиаберрантные клетки. У трех особей *Lycastopsis* sp. имелось по одной клетке с множественными аберрациями хромосом: клетка, содержащая три одиночных и один парный фрагмент; клетка с одним одиночным и двумя парными фрагментами и клетка, содержащая четыре одиночных и один парный фрагмент. У одного эмбриона *M. palmata* обнаружена клетка с одним одиночным и двумя парными фрагментами. У *P. dumerilii* две особи имели мультиаберрантные клетки: клетка с тремя одиночными фрагментами, клетка с двумя одиночными фрагментами и мостом с фрагментом, клетка с тремя одиночными мостами и мостом с фрагментом. У одной особи *N. communis* обнаружена клетка с тремя фрагментами. Остальные клетки этих гидробионтов, также как у гидробионтов из других исследованных районов, содержали по одной аберрации, реже – две.

У двух червей *P. dumerilii* из Лефкады и у 5 особей *N. communis* из пресноводного водоема обнаружены также локальные участки с пикнозом ядер (рис. 1).

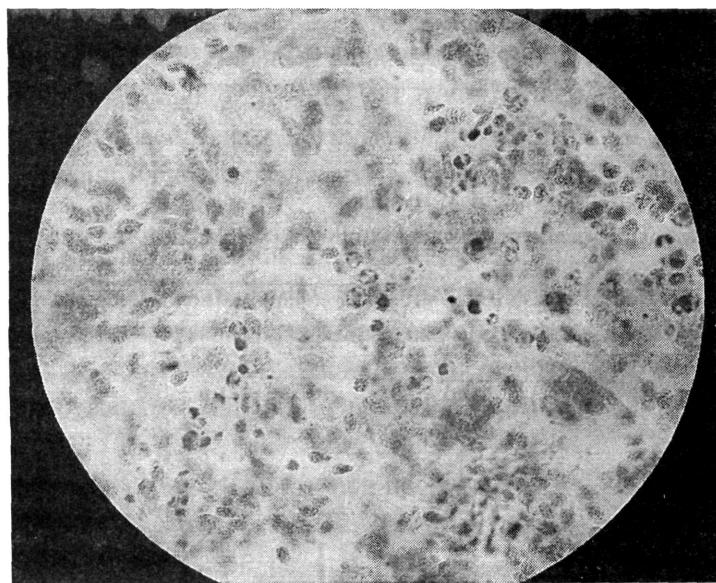


Рис. 1 Пикноз ядер в клетках *Nais communis* из водоема на о. Икария

Fig. 1. Pyknosis of cells' nuclei of *Nais communis* from the Ikaria Island pond

Известно, что пикнотические ядра свидетельствуют о гибели клеток. Ранее мы наблюдали пикноз ядер в клетках эмбрионов ракообразных и рыб при действии высоких доз ионизирующей радиации, некоторых химических мутагенов (ДДТ), а также в клетках гидробионтов в районах сильного антропогенного загрязнения.

Какова причина происхождения мультиаберрантных клеток и пикноза ядер? В работах [5, 7] показано, что атомы урана и других тяжелых радиоэлементов способны образовывать в живых организмах микроскопления раз-

мером до 200 μ , где концентрация этих элементов может превышать их среднее содержание в тканях в сотни и тысячи раз. Мощности доз радиации в микроскоплениях также могут быть на несколько порядков больше.

Основываясь на этих данных, можно предполагать, что множественные аберрации хромосом и пикноз ядер были индуцированы действием агрегатов естественных радионуклидов, лежащих в непосредственной близости от ядерных структур. Кроме того, высокая температура воды и низкая величина pH (5,3 – 6,0) в районах гидротермальных источников также могут оказывать повреждающее или модифицирующее воздействие. В [15] показано, что накопление ^{241}Am прудовиком при pH 5 было в несколько раз больше, чем при pH 8. Возможно, что низкая величина pH интенсифицирует накопление в организме и других актинидов, в частности, урана и тория.

Мы провели анализ поклеточного распределения аберраций хромосом у гидробионтов с наиболее высоким уровнем хромосомного мутагенеза. Такой анализ был предложен нами для идентификации радиационных, хи-

мических и сочетанных эффектов в природных популяциях гидробионтов [6, 18]. Было показано, что наибольшее соответствие эмпирических распределений аберраций по клеткам теоретическому распределению Пуассона наблюдается при γ - и β -радиационном воздействии и в случае его большей эффективности при сочетанном действии с химическими мутагенами (тяжелыми металлами и хлороганическими соединениями). При химическом воздействии и при его большей эффективности в сочетании с ионизирующим излучением имеется лучшее соответствие теоретическому геометрическому распределению.

Как можно видеть в табл. 2, в двух случаях (*Lycastopsis sp.* и *P. dumerilii*) наблюдаемое число клеток с одной аберрацией меньше ожидаемого для обоих теоретических распределений, а число мультиаберрантных клеток больше.

Табл. 2. Распределение аберраций хромосом по клеткам гидробионтов из Лефкады, Термы и пресноводного водоема на о. Икария

Table 2. Distribution of chromosome aberrations in cells in aquatic organisms from Lefkada, Therma and freshwater pond in Ikaria Island

Вид	Число аберраций в клетке	Частоты		
		Наблюдаемые	Ожидаемые для распределения Пуассона	Ожидаемые для геометрического распределения
<i>Lycastopsis sp.</i>	0	405	395.6	396.3
	1	9	21.8	20.6
	2	1	0.6	1.1
	3	1	0.01	0.06
	4	1	0	0
	5	1	0	0
<i>Platynereis dumerilii</i>			319.7	320.2
	0	327	20.6	19.3
	1	10	0.7	1.2
	2	1	0.01	0.07
	3	2	0	0
	4	1		
<i>Melita palmata</i>	0	916	913.8	914.9
	1	34	37.4	35.7
	2	1	0.8	1.4
	3	1	0.01	0.05
			$\chi^2 = 2.063$	$\chi^2 = 0.291$
<i>Nais communis</i>	0	138	134.8	135.6
	1	9	14.4	13.0
	2	2	0.8	1.2
	3	1	0.03	0.1
			$\chi^2 = 7.77$	$\chi^2 = 3.50$

У *M. palmata* и *N. communis* поклеточное распределение aberrаций хромосом наиболее соответствует геометрическому распределению. Если у *Lycastopsis sp.* и *P. dumerilii* исключить из анализа мультиаберрантные

Табл. 3. Распределение aberrаций хромосом по клеткам гидробионтов из Лефкады и Термы (мультиаберрантные клетки исключены)

Table 3. Distribution of chromosome aberrations in cells of aquatic organisms from Lefkada and Therma (multiaberrant cells are excluded)

Вид	Число aberrаций в клетке	Частоты		
		Наблюдаемые	Ожидаемые для распределения Пуассона	Ожидаемые для геометрического распределения
<i>Lycastopsis sp.</i>	0	405	404.1	404.2
	1	9	10.7	10.5
	2	1	0.14 $\chi^2 = 0.067$	0.27 $\chi^2 = 0.057$
<i>Platynereis du- merilii</i>	0	327	326.2	326.5
	1	10	11.6	11.1
	2	1	0.2 $\chi^2 = 0.056$	0.4 $\chi^2 = 0.022$

Хотя из-за малого среднего числа aberrаций на клетку трудно ожидать существенно-го различия в соответствии тому или другому типу теоретического распределения, однако имеется тенденция к лучшему соответствуию эмпирических распределений геометрическому распределению. Такой характер поклеточного распределения aberrаций у этих двух видов гидробионтов, а также у *M. palmata* и *N. communis* указывает на химическое воздействие. Вероятно, в этих случаях имеются, наряду с действием α-излучения, химические эффекты естественных радионуклидов как тяжелых металлов - химических токсикантов.

Для сравнения мы провели анализ полученных нами ранее данных о количестве aberrаций хромосом в клетках эмбрионов линя *Tinca tinca* L. ($6.5 \pm 0.9\%$ клеток с aberrациями хромосом) из озера Глубокое в 10-км Чернобыльской зоне. В этом озере максимальная доза γ- и β-излучения, рассчитанная на основе концентраций ^{90}Sr и ^{137}Cs в макрофитах [2] с использованием переходного коэффициента, предложенного в работе [9], была около 5

клетки как индуцированные, вероятно, α-излучением, то имеется лучшее соответствие между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами (табл. 3).

μГр/ч. Однако суммарная концентрация α-излучающих искусственных радионуклидов в воде и макрофитах этого озера [2] существенно меньше общей концентрации естественных α-радионуклидов в водорослях и морской воде вблизи гидротермальных источников на о. Икарии [16]. Среди 14 эмбрионов линя в оз. Глубоком только один имел две мультиаберрантные клетки (4 и 5 aberrаций). Если эти клетки исключить из анализа, наблюдается лучшее соответствие поклеточного распределения aberrаций хромосом теоретическому Пуассоновскому (табл. 4).

Очевидно, aberrации хромосом у эмбрионов линя в водоеме чернобыльской зоны были индуцированы, главным образом, ионизирующей радиацией, включая α-излучение, в то время как на о. Икария в клетках водных организмов мы наблюдаем, вероятно, химические и α-радиационные эффекты естественных радионуклидов.

Табл. 4. Распределение аберраций хромосом в клетках эмбрионов из оз. Глубокое в 10-ти км чернобыльской зоне (мультиаберрантные клетки исключены)

Table 4. Distribution of chromosome aberrations in cells of *Tinca tinca* embryos from the lake Glubokoe in 10-km Chernobyl zone (multiaberrant cells are excluded)

Вид	Число абер- раций в клет- ке	Частоты		
		Наблюдаемые	Ожидаемые для рас- пределения Пуассона	Ожидаемые для геометрического распределения
<i>Tinca tinca</i>	0	729	729.7	731.6
	1	50	48.6	45.4
	2	1	1.6	2.8
			$\chi^2 = 0.266$	$\chi^2 = 1.632$

Выводы. 1. У гидробионтов в районах выхода гидротермальных источников на о. Икария в Эгейском море обнаружен повышенный уровень хромосомного мутагенеза, мультиаберрантные клетки и пикноз ядер. 2. Генотоксические эффекты в клетках гидробионтов

- обусловлены, по-видимому, комплексным влиянием низкой величины pH, высокой температуры воды и повышенного содержания естественных радионуклидов (возможно, в форме микроагрегатов).
- Бородкин П. А. Цитогенетические исследования микропопуляций сибирской красной полевки в различных радиоэкологических условиях // Экология. - 1981. - Вып. № 5. - С. 44 – 50.
 - Гудков Д. И., Зуб Л. Н., Деревец В. В. и др.. Радионуклиды ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{238}Pu , $^{239+240}\text{Pu}$ и ^{241}Am в макрофитах Красненской поймы: видоспецифичность концентрирования и распределение в компонентах фитоценоза // Радиационная биология. - Радиоэкология. - 2002. **42**, вып. № 4. - С. 419 – 428.
 - Маслова К. И. Материй Л. Д., Груздев В. И. Изменчивость относительного веса некоторых органов и гематологических показателей у полевок-экономок, обитающих в различных радиоэкологических условиях // Вопросы радиоэкологии наземных биогеоценозов. Сыктывкар, - 1974. - С. 120 – 135.
 - Попова О. В., Шершунова В. И., Коданева Р. П., Таскаев А. И. Проявление хлорофильной недостаточности в природных популяциях горошка мышиного (*Vicia cracca* L.) // Генетика. - 1985. - **2**, вып. 4. - С. 670 – 672.
 - Рисик Н. С. Уран и плутоний в морских организмах / Морская радиохемоэкология и проблема загрязнений. - Киев: Наук. думка, - 1984. - С. 103 – 113.
 - Цыцугина В. Г., Поликарпов Г. Г. Идентификация действия радиоактивного, химического и сочетанного загрязнения на природные популяции гидробионтов // Радиационная биология. - Радиоэкология. - 2002. **42**, вып. № 5. - С. 569 – 573.
 - Цыцугина В. Г., Рисик Н. С., Лазоренко Г. Е. Искусственные и естественные радионуклиды в жизни гидробионтов // Под ред. Г. Г. Поликарпова. - Киев: Наук. думка. - 1973. - 152 с.
 - Abraham A., Nilan S. A., Ramachandran K., Kuriacham P. J. Chromosome aberrations in *Spinifex littorius* from the Monasito Belt // Cytologia. - 1976. - **41**, No. № 2. - P. 301 - 311.
 - Amiro B. D. Radiological dose conversion factors for generic non-human biota used for screening potential ecological impacts // J. Environ. Radioactivity. - 1997. - **35**, № 1. - P. 37 – 51.
 - Depoux M., Darebroux M. A. Genetic effects on system of tobacco over a uranous outcrop in the Permain Basin of Lodeve (Heraut, France) // Mutat. Res. - 1981. - **82**, № 1. - P. 101 – 110.
 - Mewissen D. Y., Damblon J., Bacq Z. M. Comparative sensitivity to radiation of seeds from wild plant grown on uraniferous and non-uraniferous soils // Nature. - 1959. - **183**. № 4673P. - 1449.
 - Osburn W. S. Variation in clones of *Penstemon* growing in natural areas of different radioactivity // Science. - 1961. - **34**. № 3475. - 342 p.
 - Polikarpov G. G. Conceptual model of responses of organisms, populations and ecosystems to all possible dose rates of ionising radiation in the environment // Radiat. Protect. Dosim. - **75**, № 1 - 4. - P. 181 – 185.
 - Takahashi C. S. Cytogenetical studies on the effects of high natural radiation levels in *Tityus bahiensis* (Scorpiones, Buthidae) from Moro de Ferro // Brasil Radiat. Res. - 1976. - **67**, № 2. - P. 371 – 381.

15. Thiels G. M., Murray C. N., Vanderborgh O. L. The effects of water acidity and seasonal variability on the distribution of ^{241}Am in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* L. // Health Phys. – 1984. – 47, № 3. – P. 485 – 487.
16. Trabidou G., Florou H., Angelopoulos A., Satelliou L. Environmental study of the radioactivity of the spas in the Ikaria island // Radiat. Protect. Dosim. - 1996. – 63, № 1. - P. 63 – 67.
17. Tsytsugina V.G. Chromosome mutagenesis in populations of aquatic biota in the Black Sea, Aegean Sea, and Danube and Dnieper rivers, 1986 – 1989 / Proc. of seminar on comparative assessment of the environmental impacts of radionuclides released during three major nuclear accidents: Kyshtym, Windscale, Chernobyl. Luxembourg, 1 – 5 Oct. 1990. - II. - P. 895 – 904.
18. Tsytsugina V.G. An indicator of radiation effects in natural populations of aquatic organisms // Radiat. Protect. Dosim. - 1998. – 75, № 1 – 4. - P. 171 – 173.

Поступила 17 января 2005 г.

Мультиаберантні клітини і пікноз ядер у гідробіонтів із району з підвищеним вмістом природних радіонуклідів. В. Г. Цицугіна, Х. Флору, Г. Г. Полікарпов. Досліджено аберації хромосом у клітинах гідробіонтів на о. Ікарія в Егейському морі, де поблизу гідротермальних джерел спостерігається підвищений вміст природних радіонуклідів. У ракоподібних і червів у цих районах виявлені найбільш високий рівень хромосомного мутагенезу, мультиаберантні клітини і пікноз ядер. Передбачається, що генотоксичні ефекти індуковані комплексним впливом низької величини pH, високої температури води і підвищеного вмісту природних радіонуклідів.

Ключові слова: Егейське море, о. Ікарія, природні радіонукліди, гідробіонти, аберації хромосом, пікноз ядер

Multiaberrant cells and pycnotic nuclei in hydrobionts from the area with higher contents of natural radionuclides. V. G Tsytsugina, H. Florou, G. G. Polikarpov. Chromosome aberrations in cells of hydrobionts have been studied in areas around the hydrothermal spas with elevated level of natural radionuclides in Ikaria island in the Aegean Sea. In worms and crustaceans higher level of chromosome mutagenesis, multiaberrant cells and pycnotic nuclei were found. The assumption may be made that observed genotoxic effects could be attributed to the combined action of low pH, high water temperature and heavy natural radionuclides.

Key words: Aegean Sea, Ikaria Isl., natural radionuclides, hydrobionts, chromosome aberrations, pycnotic nuclei