

Д. А. Петрашова, Н. К. Белишева

### **ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ НЕЙТРОННОЙ КОМПОНЕНТЫ КОСМИЧЕСКИХ ЛУЧЕЙ В КЛЕТКАХ МЕРИСТЕМЫ *ALLIUM CEPA***

#### **Аннотация**

Показано, что при инкубации биологических объектов (*Allium cepa* L.) в специальной борированной камере с парафиновым покрытием, поглощающем нейтронную компоненту вторичных космических лучей (КЛ) с энергиями < 50 Мэв, в меристеме проростков выявляются специфические цитогенетические эффекты. Наблюдается снижение скорости пролиферации клеток, возрастание частоты встречаемости мостов в анафазе и телофазе, микроядер в клетке, а также появление агглютинации хромосомом и двуядерных клеток.

#### **Ключевые слова:**

*нейтронная компонента космических лучей, нейтроны, экранирование, Allium-test, патологии митоза, микроядра, митотический индекс.*

D. A. Petrashova, N. K. Belisheva

### **THE CYTOGENETIC EFFECTS OF THE COSMIC RAYS HIGH-ENERGY NEUTRON COMPONENT IN THE *ALLIUM CEPA* MERISTEMATIC CELLS**

#### **Abstract**

We showed the specific cytogenetic effects in the *Allium cepa* meristem cells to be detected when incubating in the special borated paraffinic device absorbing of the cosmic rays neutron component with energy < 50 MeV. The cell proliferation speed decreasing, anaphase and telophase bridges frequency increasing, micronucleus frequency increasing, chromosome agglutination and binucleus cells appearance are observed.

#### **Key words:**

*cosmic rays neutron component, neutrons, shielding, Allium-test, mitosis pathology, micronucleus, mitotic index.*

#### **Введение**

Космические полеты, а также тщательно подготавливаемая миссия на Марс требуют знания о возможных последствиях воздействия высокоэнергетических частиц на организм космонавтов [1-3]. Представление о возможных эффектах заряженных частиц на биологические объекты были получены в результате космических [1, 3] и наземных экспериментов [4-6].

Вместе с тем, наземные эксперименты, в которых изучают эффекты моноэнергетических потоков тяжелых заряженных частиц [5] или тепловых нейтронов [7], не дают полного представления о возможных последствиях воздействия на организм космонавта потока солнечных космических или галактических космических лучей (СКЛ и ГКЛ соответственно), энергетический спектр и плотность потока которых варьируют в зависимости от характера солнечной активности (СА). Кроме того, на организм космонавта воздействуют вторичные компоненты КЛ, образующиеся в результате взаимодействия заряженных частиц с веществом корабля. Причем основной поток вторичных биоэффективных частиц внутри космического корабля представлен в основном нейтронами разных энергий [1, 2].

В силу того что в контролируемом эксперименте на ускорителях очень сложно получить потоки нейтронов с энергетическими спектрами, близкими к естественным фоновым воздействиям вторичных космических лучей (КЛ), генотоксичность вторичных нейтронов у поверхности практически не изучена. Только в отдельных исследованиях была показана биоэффективность нейтронной компоненты вторичных СКЛ у поверхности Земли в период солнечных протонных событий в октябре 1989 г. [6, 8], а также при фоновых вариациях ГКЛ [9].

С нашей точки зрения, именно наземные эксперименты по изучению биоэффективности нейтронной компоненты вторичных КЛ могут приблизить к пониманию того, какие последствия для организма космонавтов могут вызывать вторичные нейтроны в жизненном пространстве космического корабля. Особенно важно выявить эффекты полного спектра нейтронного потока и отдельных его спектральных составляющих, что позволит экранировать организм космонавта от наиболее биоэффективных компонент нейтронного спектра.

Для выявления вклада нейтронной компоненты с высокими энергиями (способных вступать в ядерные взаимодействия с веществом) в индукцию генетических нарушений у различных биологических объектов при фоновых вариациях КЛ, мы использовали специальную камеру, экранирующую биологические объекты от воздействия нейтронов с энергиями < 50 МэВ. Эта камера была создана сотрудниками Полярного геофизического института КНЦ РАН Ю. В. Балабиным и Е. А. Маурчевым, которые рассчитали параметры парафинового экрана на основе программы, позволяющей моделировать прохождение частиц через вещество [10-12]. Сравнение частоты и характера цитогенетических нарушений в исследуемых объектах при фоновом воздействии КЛ у поверхности Земли и в условиях экранирования позволит понять роль КЛ в функционировании биосистем и возможные эффекты КЛ в период космических миссий.

## **Материалы и методы**

Экспозиция биологических объектов к высокоэнергетической нейтронной компоненте вторичных КЛ проводилась в специальной конструкции (рис.1А), состоящей из парафина с борированной внутренней камерой для инкубации, маркированной стрелкой на рис.1Б. Толщина парафинового слоя рассчитана таким образом, чтобы все нейтроны с энергией до 50 МэВ поглощались экраном.

В качестве объекта исследования был выбран лук репчатый (*Allium cepa* L.), который рекомендован экспертами Всемирной организации здравоохранения как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды. Цитогенетические нарушения в клетках этого объекта при тестировании степени генотоксичности воздействий хорошо коррелируют при сходных воздействиях с цитогенетическими нарушениями в клетках млекопитающих и человека [13, 14].

Эксперимент включал три этапа исследований. Первый этап – анализ динамики возможных нарушений митоза и ядерной структуры в клетках меристемы (20-25.04.2015). Второй этап – определение всхожести семян и интенсивности роста проростков (26.04-6.05.2015). Третий этап – оценка уровня возможных нарушений митоза и ядерной структуры в клетках меристемы

после недельной экспозиции в парафиновой камере. Этот этап являлся продолжением 2-го этапа.

Для исследований в рамках 1-го этапа семена *A. sera* помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и проращивали при температуре +24°C до появления корешков размером 0.2-0.5 см. Затем чашки Петри с семенами помещали в холодильник для синхронизации митотических циклов в проростках. После этого семена с одинаковыми по размеру проростками помещали в другие чашки Петри рядами по 10 семян. Всего было подготовлено таким образом шесть чашек, три из которых были помещены в парафиновую камеру, а три – в контейнер из папье-маше в качестве контроля. Для фиксации (5 фиксаций в опыте и контроле) отбирали по 10 корешков через каждые 18 ч в соответствии со стандартной методикой (это время соответствует периоду митотического цикла у *A. sera*).



Рис.1. Конструкция для инкубации биологических объектов в условиях воздействия высокоэнергетической нейтронной компоненты вторичных космических лучей

Для второго этапа исследований семена *A. sera* помещали в 6 чашек Петри (по 100 шт. на чашку), из которых три предназначались для инкубации в парафиновой камере, а три – в контейнере из папье-маше в качестве контроля. Ежедневно семена проверяли на прорастание. Когда появились первые проростки, их измеряли с использованием циркуля и линейки. Все данные вносили в таблицы.

После завершения замеров образцы корешков фиксировали по стандартной методике. Окрашивание корешков проводили 1 %-м ацетоорсеином при температуре 85 °С в термостате 15 мин, оставляли на сутки в свежем красителе при температуре 4 °С. Давленные препараты меристемы *A. sera* готовили в капле 45 %-й уксусной кислоты [15]. На препарате каждого корешка подсчитывали не менее 1000 клеток, учитывая все стадии митоза (интерфаза, профазы, метафаза, анафаза, телофаза), на основании чего вычисляли митотический индекс (МИ), а также оценивали все видимые нарушения митоза и ядерной структуры. Для каждой фиксации анализировали не менее трех препаратов.

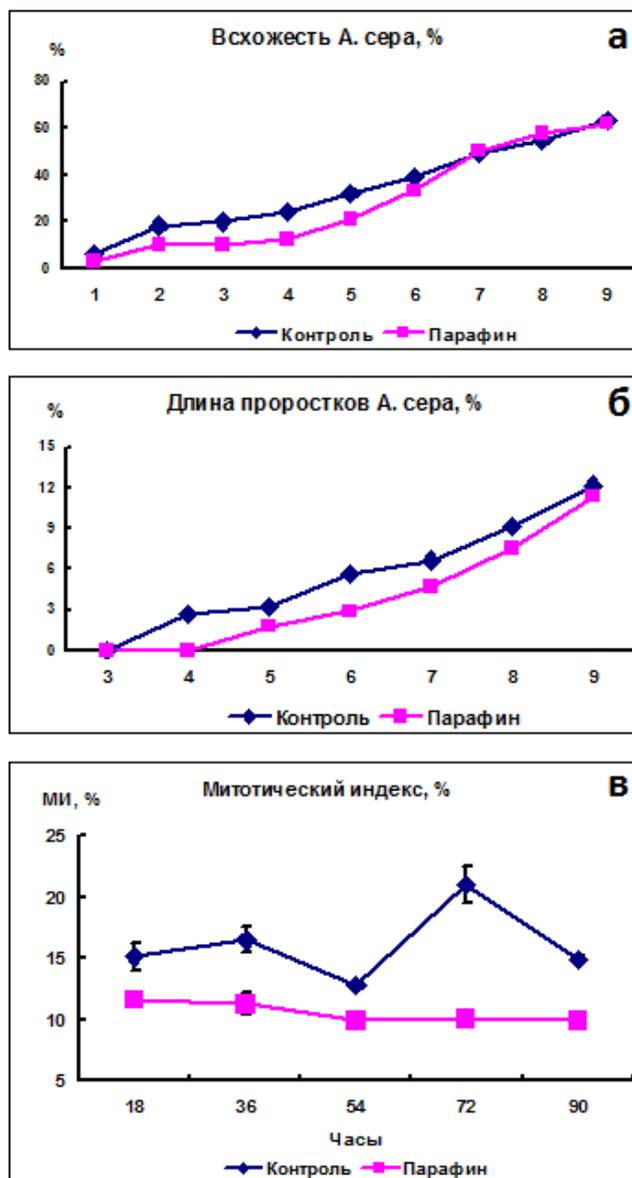


Рис.2. Показатели скорости пролиферации *A. cerealis* в экранированной камере (в условиях воздействия нейтронов с энергиями > 50 Мэв) и в контроле

### Результаты и обсуждение

Установлено, что всхожесть семян, длина проростков и митотический индекс в контроле был достоверно выше, чем в камере инкубации в условиях воздействия нейтронов с энергиями > 50 Мэв (рис.2).

При исследовании патологии митоза и ядра были выделены три условные группы нарушений: мосты в анафазе и телофазе, агглютинация хромосом и прочие патологии митоза (фрагменты хромосом в метафазе, отставание хромосом в анафазе и телофазе, моноцентрический и многополюсной митозы). Примеры патологий митоза приведены на рис.3.

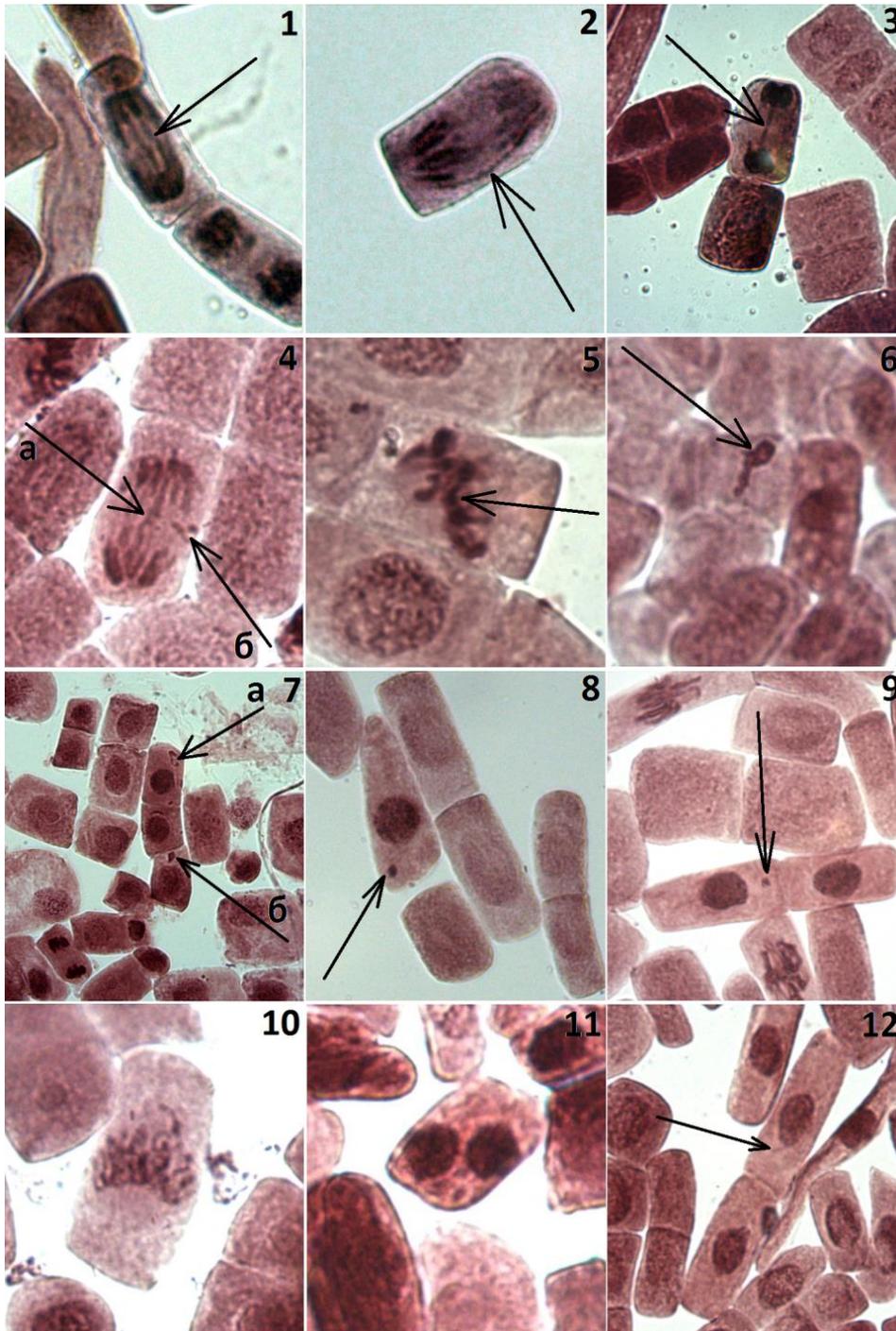


Рис.3. Патологии митоза в меристеме проростков *A. sera* при инкубации в парафиновой камере: 1, 2, 4а – мосты в анафазе; 3 – мост в телофазе; 5, 6 – агглютинация хромосом; 7б, 8, 9 – микроядра в клетке; 4б – отставание хромосомы в анафазе; 7а – хромосома в интерфазе; 10 – монополюсной митоз; 11 – двуядерная клетка; 12 – ядерная почка

Анализ препаратов показал, что число нарушений митоза в контроле не превышало 5 % от общего числа метафаз, анафаз и телофаз (МАТ), а при экранировании низкоэнергетической нейтронной компоненты – 12%. Из нарушений митотического деления клеток преобладали в обеих группах мосты в анафазе и телофазе, причем в корешках, проросших в парафиновой камере, эта патология встречалась чаще (рис.3, 4). Образование мостов может быть связано с наличием в кариотипе дицентрической хромосомы или со слипанием теломерных участков хромосом [16].

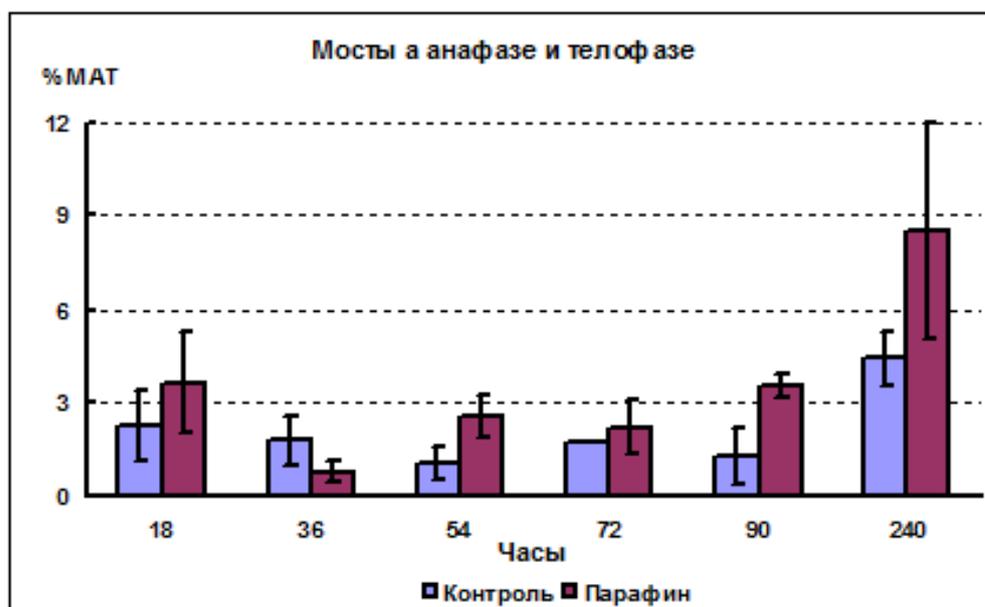


Рис.4. Доля нарушений митоза в виде мостов на стадии анафазы и телофазы в меристеме проростков *A. сера* при инкубации в парафиновой камере и в контроле

В корешках *A. сера* при инкубации в парафиновой камере, в отличие от контроля, встречается агглютинация хромосом. Эта патология возникает в результате слипания хроматина в метафазе или анафазе.

Основной по встречаемости патологией ядра являлось наличие в клетках микроядер (рис.3). Судя по графику на рис.5, динамика возникновения микроядер носит циклический характер, по-видимому, в контрольной группе период этого цикла более растянут. Однако данное предположение требует дополнительного изучения. В целом, наличие микроядер свидетельствует о значительном числе нерепарированных повреждений хромосомного материала, что ведет к цитогенетической нестабильности клеточных популяций [17].

При инкубации в парафиновой камере возникали нарушения, связанные с запаздыванием цитокинеза, такие как образования двуядерных клеток (рис.3). Двуядерные клетки образуются в результате нарушения процесса образования внутри родительской клетки клеточной перегородки – фрагмопласта [18]. В контрольной группе данная патология в текущем эксперименте не выявлена.

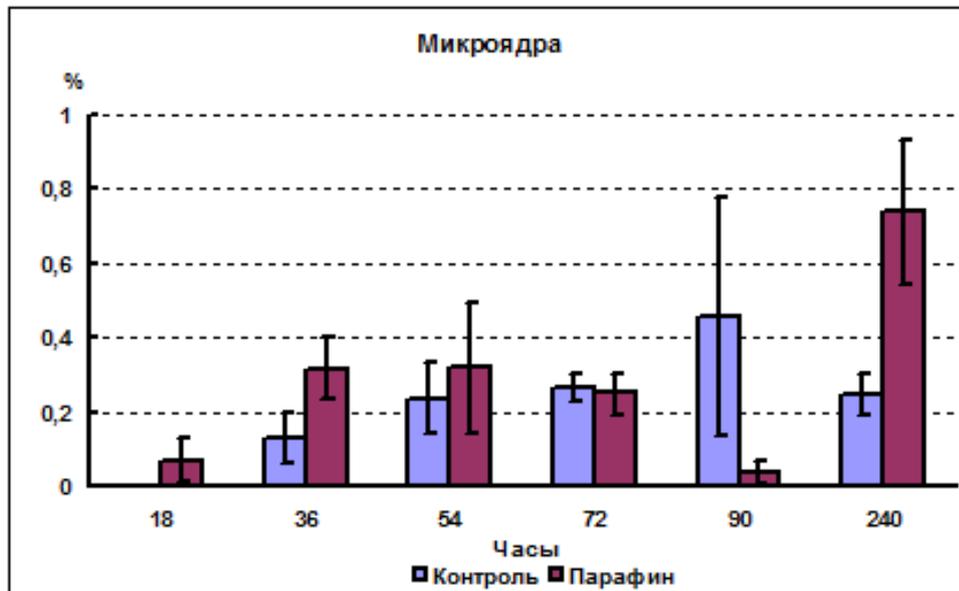


Рис.5. Доля клеток с микроядрами в меристеме проростков *A. cere* при инкубации в парафиновой камере и в контроле

### Заключение

Таким образом, при инкубации в парафиновой камере проростков *A. cere* в условиях воздействия высокоэнергетической нейтронной компоненты КЛ с энергиями  $> 50$  Мэв наблюдается снижение скорости пролиферации клеток, возрастает частота встречаемости мостов в анафазе и телофазе и микроядер в клетке, появляются такие патологии, как агглютинация хромосом и двуядерные клетки. Такие летальные для клетки патологии, как агглютинация, наряду с запаздыванием цитокинеза, могут быть специфическими показателями биоэффективности высокоэнергетической нейтронной компоненты КЛ. Однако чтобы подтвердить достоверность выявленных цитогенетических эффектов, необходимо повторить данный эксперимент еще в нескольких повторностях и желательно с привлечением дополнительных растительных тест-объектов, например, использовавшегося в других наших работах маша (*Vigna radiata*) [19].

В целом наши исследования могут внести свой вклад в понимание процессов взаимодействия вторичных заряженных частиц с генетическим материалом клетки во время космического полета и оценить дозу, приводящую к необратимым генетическим повреждениям.

### Литература

1. Акоев И. Г., Сакович В. А., Юров С. С. Биофизические основы действия космической радиации и ускорителей // Проблемы космической биологии. Л.: Наука, 1989. Т. 60. С. 232-248.
2. Space radiation measurements on board ISS THE DOSMAP EXPERIMENT / G. Reitz, R. Beaujean, E. Benton, S. Burmeister, Ts. Dachev, S. Deme, Luszik-M. Bhadra, P. Olko // Radiation Protection Dosimetry. 2005. Vol. 116, No. 1-4. P. 374-379.

3. Шафиркин А. В., Григорьев Ю. Г. Межпланетные и орбитальные космические полеты. Радиационный риск для космонавтов (радиобиологическое обоснование) / Гос. научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; ФГУ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна». М.: Экономика, 2009. 639 с.
4. Goodhead D. T. Energy deposition stochastics and track structure: what about the target? // *Radiation Protection Dosimetry*. 2006. Vol. 122, No. 1-4. P. 3-15, doi:10.1093/rpd/ncl498.
5. Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion / В. Jakob, J. Splinter, M. Durante, G. Taucher-Scholz // *PNAS*. 2009. Vol. 106, No. 9. P. 3172-3177.
6. The effect of cosmic rays on biological systems – an investigation during GLE events / N. K. Belisheva, H. Lammer, H. K. Biernat, E.V. Vashenyuk // *Astrophys. Space Sci. Trans.* 2012. 8. P. 7–17.
7. Relative biological effects of neutron mixed-beam irradiation for boron neutron capture therapy on cell survival and DNA double-strand breaks in cultured mammalian cells / К. Okumura, Y. Kinashi, Y. Kubota, E. Kitajima, R. Okayasu, K. Ono, S. Takanashi // *Journal of Radiation Research*. 2013. 54. P. 70-75.
8. Belisheva N. K. Biological effectiveness of cosmic rays near the Earth surface // *Космические факторы эволюции биосферы и геосферы: сб. статей Междисциплинарного коллоквиума (Москва, 21-23 мая 2014 г.)*. СПб.: Астрономическое общество, 2014. С. 187-202.
9. Связь динамики слияния клеток, растущих in vitro, с вариациями интенсивности нейтронов у поверхности земли / Н. К. Белишева, Б. М. Кужевский, Э. В. Вашенюк, В. К. Жиров // *ДАН*. 2005. Т. 402, № 6. С. 254-257.
10. Fine structure of neutron multiplicity on neutron monitors / Yu. V. Balabin, B. B. Gvozdevsk, E. A. Mauricev, E. V. Vashenyuk, D. D. Dzhpappuev // *Astrophys. Space Sci. Trans.* 2011. 7. P. 283-286.
11. Transport of solar protons through the atmosphere during GLE / E. A. Mauricev, Yu. V. Balabin, E. V. Vashenyuk, B. B. Gvozdevsky // *J. Phys. Conf. Ser.* 2013. 409 012200, doi:10.1088/1742-6596/409/1/012200.
12. A new numerical model for investigating cosmic rays in the Earth's atmosphere / E. A. Mauricev, Yu. V. Balabin, B. B. Gvozdevsky, E. V. Vashenyuk // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Physics*. 2015. Vol. 79, Issue 5. P. 657-659.
13. Barberrio A., Voltolini J. C., Mello M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the Allium test // *Ecotoxicology*. 2011. Vol. 20. P. 927-935.
14. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas*. 1985. Vol. 102. P. 99-112.
15. Медведева М. Ю., Болсуновский А. Я., Зотина Т. А. Цитогенетические нарушения у водного растения *Elodea canadensis* в зоне техногенного загрязнения р. Енисей // *Сибирский экологический журнал*. 2014. № 4. С. 561-572.
16. Горячкина О. В., Сизых О. А. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно-нарушенных районах г. Красноярска и его районах // *Хвойные бореальной зоны*. 2012. XXX. № 1-2. С. 46-51.

17. Цитогенетические реакции семенного потомства на комбинированное антропогенное загрязнение в районе Новолипецкого металлургического комбината / О. С. Машкина, В. Н. Калаев, Л. С. Мурая, Е. С. Лепикова // Экологическая генетика. 2009. 8 (3). С. 17-29.
18. Малецкий С. И., Колодяжная Я. С. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток и ее влияние на репродуктивные признаки у покрытосеменных растений // Успехи современной биологии. 1999. Т. 119, № 2. С. 128-143.
19. Петрашова Д. А., Белишева Н. К., Мельник Н. А. Оценка генотоксичности природного ионизирующего излучения в клетках *Vigna radiata* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, № 5(3). С. 829-831.

**Сведения об авторах**

**Петрашова Дина Александровна,**

к.биол.н., научный сотрудник Научного отдела медико-биологических проблем адаптации человека в Арктике КНЦ РАН, г. Апатиты, petrashova@admksk.apatity.ru

**Белишева Наталья Константиновна,**

д.биол.н., заведующий Научным отделом медико-биологических проблем адаптации человека в Арктике КНЦ РАН, г. Апатиты, natalybelisheva@mail.ru