



МУТАГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

© В.Н. Калаев, А.К. Буто-
рина, О.Ю. Шелухина

Воронежский государственный
университет, Воронеж

✿ Проведен цитогенетический мониторинг загрязнения окружающей среды в крупном промышленном центре Курской магнитной аномалии — г. Старый Оскол с использованием в качестве тест-объекта семенного потомства березы повислой. Показано, что на опытных территориях в корневой меристеме проростков семян увеличивается число делящихся клеток, изменяется длительность прохождения клетками стадий профазы и метафазы митоза, возрастает число и спектр нарушений митоза. Изменяются характеристики ядрышек: уменьшается площадь поверхности одиночных ядрышек, возрастает число клеток с остаточными ядрышками на стадии метафазы — телофазы митоза. Обсуждается возможность применения методов кластерного анализа для оценки загрязнения территории по совокупности цитогенетических показателей. С использованием выведенной нами ранее формулы рассчитан уровень микродер в буккальном эпителии детей, проживающих на обследуемых территориях, по цитогенетическим показателям семенного потомства березы повислой и проведено его сравнение с экспериментально полученной величиной. Установлена адекватность предлагаемой математической модели. Сделан вывод о перспективности использования древесных растений, в частности, березы повислой, для оценки генотоксичности окружающей среды в крупном промышленном центре.

✿ **Ключевые слова:** Антропогенное загрязнение, береза повислая, митотическая активность, кластерный анализ, патология митоза, цитогенетический мониторинг, характеристики ядрышек

ОЦЕНКА АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ РАЙОНОВ Г. СТАРЫЙ ОСКОЛ ПО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

Цитогенетический мониторинг — это система мер слежения, оценки и прогнозирования поведения генетической системы организма в условиях антропогенного загрязнения [44]. Цель такого мониторинга — регистрация возникающих цитогенетических нарушений, в первую очередь, хромосомных аномалий, их фенотипических проявлений и распространения в популяциях, а также обнаружение хромосомных мутаций в тест-системах, близких к человеку [18].

Изучение механизмов действия мутагенов и закономерностей проявления изменений в митозе и мейозе представляет важную задачу в оценке генетической опасности факторов окружающей среды, так как под воздействием мутагенов возникают различные аномалии в клетках живых организмов [44].

В оценке степени загрязнения окружающей среды в настоящее время широко используются древесные растения. В условиях загрязнения анализировали видовой состав дендрофлоры [15], изучали возраст, жизнеспособность, морфологию хвои и побегов [30, 39, 45], проводили исследования генеративных органов [31, 32], выявляли аномалии в гаметогенезе [37], исследовали цитогенетические нарушения в митозе и мейозе [7, 13, 48, 49, 50, 52, 53, 57], изучали анатомические нарушения в меристематических тканях в условиях радиоактивного загрязнения [24, 48]. Преимущества древесных, хвойных и лиственных растений перед другими тест-объектами заключаются в том, что они являются многолетними. Это позволяет отслеживать отдаленные последствия воздействия мутагенов, определять характер изменения при длительном их воздействии. Древесные растения широко используются в озеленительных зонах вокруг промышленных объектов, вдоль шоссе и дорог, то есть в тех местах, где опасность антропогенного загрязнения особенно велика [12].

Установлено, что древесные растения — наиболее чувствительные компоненты лесной растительности. При одинаковых размерах хромосом древесные растения радиочувствительнее травянистых при остром облучении в 2–2,6 раза, при хроническом — в 11,2 раза [1]. Радиочувствительность хвойных ниже радиочувствительности человека всего в 1,5 раза (так, LD₅₀ для человека составляет 3,5–4 Гр, для сосны обыкновенной — 5–6 Гр [24]), при этом необходимо отметить, что растения подвергаются более интенсивному облучению по сравнению с человеком вследствие разницы в экранировании бета-излучения, специфики дезактивации у человека, способности избегать зон заражения. Все это отчасти снижает «разрыв», связанный с различной радиочувствительностью, и позволяет провести экстрапо-

ляцию последствий воздействия радиации с растительного объекта на человека [54]. Еще одна особенность древесных растений, дающая преимущества этой тест-системе, состоит в том, что леса являются естественными фильтрами. В течение года 1 га леса удаляет из воздуха до 50–70 тонн пыли [26]. При аварии на Чернобыльской АЭС леса явились своеобразным барьером и ловушкой для радионуклидов [37].

Особый интерес представляет оценка генотоксичности окружающей среды для человека с учетом цитогенетических показателей для древесных растений.

Ранее была показана связь уровня патологических митозов [11] и площади поверхности одиночных ядрышек [22, 23] у семенного потомства березы повислой на загрязненных территориях с уровнем клеток с микроядрами в буккальном эпителии детей, проживающих на тех же территориях. Получена формула:

$$Y = -3,695 + 0,8644 \ln(X) \quad (1),$$

где X — площадь поверхности одиночных ядрышек в клетках корневой меристемы корешков проростков семян березы повислой, $\mu\text{м}^2$; Y — частота встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии детей, %. Эта формула позволяет составить предварительный прогноз уровня клеток с микроядрами в эпителиоцитах детей на обследуемой территории по площади поверхности одиночных ядрышек в клетках семенного потомства деревьев березы повислой, произрастающих на той же территории.

В последнее время большое внимание уделяется всестороннему изучению влияния на организмы выхлопных газов автомобильных двигателей. По мнению специалистов, транспорт является основным источником загрязнения окружающей среды в крупных городах [2, 16, 17, 19, 20].

Главной причиной неблагоприятного воздействия автотранспорта на окружающую природную среду являются продукты сгорания топлива, образующиеся при работе двигателя. Следует также отметить, что в отличие от выбрасываемых производственными предприятиями вредных веществ, которые концентрируются по ограниченному радиусу, выхлопные газы автомобилей распространяются на всей территории населенного пункта [19].

В связи с этим определенный интерес представляет изучение влияния выхлопных газов автотранспорта на цитогенетические показатели семенного потомства древесных растений, произрастающих в промышленных городах, и оценка вклада автотранспорта в общее загрязнение городов.

Нами была предпринята попытка провести оценку загрязнения в городе Старый Оскол по цитогенетическим показателям: митотической активности, уровню и спектру патологий митоза, характеристикам ядрышек семенного потомства березы повислой (*Betula pendula Roth*), широко применяемой в озеленении городов Центрально-Черноземного региона России, сделать прогноз частоты встречаемости клеток с микроядрами у детей на обследованных территориях и сравнить расчетные данные с полученными в результате проведения микроядерного теста в буккальном эпителии детей в одном из районов г. Старый Оскол. Эти исследования не только позволят установить характер изменений цитогенетических показателей хозяйственно ценного вида березы повислой при антропогенном загрязнении, но и оценить перспективность применения древесных растений для оценки генотоксичности окружающей среды и заложить научные основы цитогенетического мониторинга с их использованием.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Общая характеристика района исследований

Исследования цитогенетических показателей семенного потомства березы повислой и микроядерный тест в буккальном эпителии детей проводили в городе Старый Оскол Белгородской области.

Город расположен в пределах Среднерусской возвышенности. Современная территория Приосколья представляет собой холмистую равнину, изрезанную оврагами, балками и речными долинами. Климат умеренно-континентальный с умеренно-холодной зимой и жарким летом. Среднегодовая температура $+8,3^\circ\text{C}$. В районе господствуют ветры восточного направления.

Старый Оскол является развитым промышленным центром. В юго-западном направлении от города расположены железорудные карьеры Стойленского (СГОК) и Лебединского (ЛГОК) горно-обогатительных комбинатов, завод металлургического машиностроения, завод АТЭ; в юго-восточном направлении — Оскольский электрометаллургический комбинат (ОЭМК).

Таким образом, г. Старый Оскол оказался в центре горно-металлургического комплекса предприятий Курской магнитной аномалии.

Вышеперечисленные производства — основные источники промышленных выбросов. Так, на долю ОЭМК приходится более 60% от валового выброса загрязнителей в год, на долю СГОК — 5–6%. Наиболее агрессивные вещества попадают в ок-

ружающую среду в жидком и газообразном состоянии (до 90 %), это в основном диоксид азота, выбрасываемый ОЭМК, взвешенные вещества и пыль, выбрасываемые СГОКом и цементным заводом.

Всего же в выбросах промышленных предприятий города регистрируется более 55 химических соединений, из них 9 относятся к первому и второму классам опасности. До 1,5 раз превышена предельно допустимая концентрация металлов (свинца, меди, никеля) в почве. Однако в отдельных районах города (исторический центр) загрязнение свинцом в 3 раза превышает установленную ПДК.

Радиационная обстановка в городе Старый Оскол характеризуется значением мощности эквивалентной дозы 0,08–0,15 мкЗв/час (что не превышает нормального уровня 0,2 мкЗв/час). Суммарная эффективная активность радионуклидов в почве колеблется от 60 до 126 Бк/кг, что не превышает ПДУ для материалов первого класса (370 Бк/кг). Таким образом, радиационная обстановка на территории города нормальная.

Качество питьевой воды неудовлетворительное (нестабильность химического состава, превышение допустимой концентрации свинца, железа, марганца, молибдена, меди, цинка в некоторые годы). Это связывают с негативным влиянием железорудных разработок.

Все вышеперечисленные факторы оказывают влияние на здоровье жителей, особенно детей.

В возрастной структуре населения города Старый Оскол дети и подростки составляют 30 %. Общий уровень заболеваемости среди них в 2,2 раза превышает таковую среди взрослых. Наиболее значителен удельный вес патологий органов дыхания — 59,8 %. Частота встречаемости заболеваний пищеварительного тракта, новообразований также находится на высоком уровне (Махотин, http://conf.intbel.ru/articles/list/?conf_id=11@page=7@sort=conf_dir@dir=).

Таким образом, экологическая обстановка в городе не вполне благополучна, что может привести к изменению цитогенетических показателей семенного потомства березы повислой и индуцировать образование микроядер в клетках буккального эпителия детей.

ВЫБОР ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПЛОЩАДОК

Исследования проводили в 3 районах г. Старый Оскол. В каждом из районов выбирали по 2 опытных территории, одна из которых находилась вблизи автодороги, а другая — во дворах. Такой выбор опытных площадей обусловлен попыткой оценить

вклад автотранспорта в возникновение возможных цитогенетических эффектов у тест-объекта. В настоящее время для снижения неблагоприятного воздействия автотранспорта на окружающую среду применяются защитные щиты и экраны, которые снижают вредные эффекты, обусловленные интенсивным движением автомобилей [32]. Дома частично или полностью экранируют дворовые территории от вредных автомобильных выбросов (большинство химических соединений, образующихся в результате работы двигателя, тяжелее воздуха (за исключением СО и воды)).

Для исследований были выбраны следующие районы города Старый Оскол:

а) Юго-западный — среднезагрязненный район. Основные загрязнители: неорганическая пыль, диоксид азота (NO_2), незначительное количество формальдегида;

опытная площадь № 1 — территория вдалеке от автодороги (во дворах);

опытная площадь № 2 — вблизи автодороги;

б) Северо-восточный — относительно чистый район. Здесь отмечено лишь превышение нормы по содержанию в воздухе диоксида азота (NO_2);

опытная площадь № 3 — территория во дворах;

опытная площадь № 4 — вблизи автодороги;

в) Центральный — наиболее загрязненный район. Основные загрязнители: диоксид серы (SO_2), оксид углерода (СО), оксид и диоксид азота (NO и NO_2), формальдегид;

опытная площадь № 5 — во дворах;

опытная площадь № 6 — вблизи автодороги.

Данные о загрязнении окружающей среды в районах исследования взяты из работы Махотина (http://conf.intbel.ru/articles/list/?conf_id=11@page=7@sort=conf_dir@dir=).

Опытные районы удалены друг от друга на расстояние 2–3 км. Точки сбора у дороги и во дворах расположены на расстоянии не менее 90–100 метров.

В качестве контроля использовали материал с «экологически чистой» территории (биостанция Воронежского госуниверситета «Веневитиново»), удаленной от исследуемых районов на расстояние 100 км. Загрязнение окружающей среды на контрольной территории не превышало предельно допустимых значений. Климатические условия контрольной и опытной территорий сходны.

СБОР МАТЕРИАЛА

Сбор семян проводили в сентябре с деревьев без видимых повреждений вредителями и грибковыми заболеваниями (по 3 дерева в каждой

опытной точке). Проращивание семян, фиксация, приготовление микропрепаратов изложены в работе Буториной с соавт. [10]. Собранные от отдельных деревьев на опытной точке семена смешивали и помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу. Проращивание производили при комнатной температуре. По достижении корешками проростков семян длины 0,5–1 см, их фиксировали в фиксаторе Карнуа (метанол (этанол): ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) в 9 часов утра по летнему времени. Для цитологического изучения семенного потомства березы повислой готовили постоянные давленные препараты. Для этого материал отмывали от фиксатора в дистиллированной воде, мацерировали в соляной кислоте (18 %) при подогревании, отмывали уксусной кислотой (45 %). Окрашивание производили ацетогематоксилином в течение 45–60 минут при комнатной температуре. Избыток красителя удаляли, промывая материал в дистиллированной воде, и готовили давленные препараты: препаративной иглой отделяли кончик проростка (1–3 мм), помещали его на предметное стекло в каплю жидкости Гойера (изготовленной по описанной ранее методике [42]), накрывали покровным стеклом и придавливали легкими ударами ручки препаративной иглы. Из одного корешка проростка изготавливали один препарат для цитологического исследования.

Препараты изучали на микроскопе LABOVAL-4 (Carl Zeiss, Jena) при увеличении 40 x 1,5 x 10 и 100 x 1,5 x 10. На каждом препарате анализировали не менее 700 клеток, с каждой опытной площади было изготовлено не менее 10 препаратов. Всего было проанализировано 50 000 клеток.

Анализируя препараты, рассчитывали следующие цитогенетические характеристики:

I. Митотический индекс, являющийся показателем митотической активности, равный отношению числа делящихся клеток к общему числу клеток на препарате, выраженный в процентах.

II. Патологии митоза. В работе использовали классификацию Алова [3], который выделяет:

1. Патологии митоза, связанные с повреждением хромосом (задержка митоза в профазе, раннее разделение хроматид в профазе, одиночные, парные и множественные ацентрические фрагменты хромосом, хромосомные и хроматидные мосты, отстаивания целых хромосом в метакинезе и расхождении их по полюсам, образование микроядер, нерасхождение сестринских хроматид, набухание и склеивание хромосом).

2. Патологии митоза, связанные с повреждением митотического аппарата (колхициновый митоз,

задержка и рассеивание хромосом в метафазе, многополюсный митоз, трехгрупповая метафаза, моноцентрический и асимметрический митоз, полая метафаза).

3. Нарушение цитотомии (запаздывание или отсутствие цитотомии, преждевременная цитотомия).

III. Доля клеток (в %) на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы митоза от общего числа делящихся клеток.

IV. Характеристики ядрышек — площадь поверхности одиночных ядрышек (мкм^2); процент клеток с разными типами ядрышек; наличие клеток с остаточными ядрышками на стадиях метафазы, анафазы и телофазы (в % от общего числа клеток на этих стадиях). Тип ядрышек определяли по классификации Челидзе и Зацепиной [40].

Для проверки адекватности прогноза уровня клеток с микроядрами в буккальном эпителии детей по площади поверхности одиночных ядрышек в клетках апикальной меристемы корня проростков семян березы повислой с использованием формулы (1), мы проводили микроядерный тест в эпителиоцитах детей в северо-восточном районе города Старый Оскол. В группе детского сада, расположенного рядом с опытной территорией № 3, у детей четырех–пяти лет (13 мальчиков и 23 девочки), не страдающих острыми и хроническими заболеваниями, ежемесячно в течение года брали соскобы слизистой оболочки полости рта. Методика проведения микроядерного теста в буккальном эпителии изложена в работе А. К. Нерсисяна с соавт. [29]. Собранный стерильным шпателем с внутренней стороны щеки материал наносили на чистые предметные стекла. Мазки высушивали на воздухе, а затем окрашивали ацетоорсеином. Препараты изучали на микроскопе LABOVAL – 4 (Carl Zeiss, Jena) при увеличении 40x1,5x10 и 100x1,5x10. Анализировали не менее 1000 клеток от каждого обследуемого ребенка. Пригодными для анализа считали клетки без видимых повреждений и деформаций ядерной мембраны. К микроядрам относили округлые, овальные либо имеющие форму полумесяца образования с ровными краями, размером 1/5–1/20 диаметра ядра клетки. Окраска микроядер соответствовала окраске основного ядра. Было проанализировано более 200 000 клеток.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе А. П. Кулаичева [26]. Цитогенетические характеристики березы повислой сравнивали по следующим критериям: встречаемость клеток (в %) с остаточными ядрышками

на стадии мета-, ана-, телофазы митоза и патологий митоза — по непараметрическому X-критерию рангов Ван-дер-Вардена, так как распределение значений этих показателей не подчиняется нормальному ($\chi^2 = 111,8$ ($P < 0,001$) и $\chi^2 = 57,9$ ($P < 0,001$), соответственно), митотический индекс, распределение клеток на различных стадиях митоза и характеристики ядрышек — по параметрическому t-критерию Стьюдента. Для выяснения влияния фактора места произрастания березы повислой на цитогенетические показатели использовали однофакторный дисперсионный анализ. Силу влияния фактора вычисляли по Снедекору в процентах. Для определения корреляционной зависимости использовали коэффициент корреляции рангов Спирмена (r_s). Кластерный анализ проводили с использованием метрики нормированного Эвклидова расстояния, стратегия группировки данных — группового соседа. В матрицу данных вносили значения следующих цитогенетических показателей: митотический индекс, процент клеток на стадии профазы, метафазы, анафазы-телофазы митоза, процент клеток с нарушениями митоза, характеристики ядрышек (площадь поверхности одиночных ядрышек (мкм^2); процент клеток с разными типами ядрышек; наличие клеток с остаточными ядрышками на стадиях метафазы, анафазы и телофазы (в % от общего числа клеток на этих стадиях)).

Микрофотосъемку проводили с использованием системы анализа видеоизображений «ВидеоТест» (Санкт-Петербург).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований цитогенетических показателей клеток апикальной меристемы корней проростков семян березы повислой представлены в таблицах 1, 2.

Дисперсионный анализ выявил влияние места сбора семян на митотический индекс (сила влияния — 8,1 %, ($P < 0,01$)). Наибольшее значение митотического индекса наблюдается на препаратах проростков семян, собранных на опытной территории № 5, наименьшее — на опытных территориях № 3 и № 4. Достоверное увеличение митотического индекса относительно контроля отмечено в образцах с опытных территорий № 2 и № 5.

При сравнении митотического индекса в клетках проростков семян березы повислой, собранных у дороги и во дворах, достоверно значимые отличия зафиксированы между опытными территориями № 1 и № 2 ($P < 0,05$).

Дисперсионный анализ показал влияние места сбора семян (сила влияния — 9,0 % ($P < 0,05$)) на количество патологических митозов в клетках семенного потомства березы повислой. Во всех районах отмечалась тенденция к возрастанию числа нарушений, за исключением опытной территории № 4. При этом достоверно значимые отличия от контроля наблюдались в точках № 1, 5, 6. Наибольшая частота встречаемости патологических митозов зафиксирована на препаратах проростков семян из самого загрязненного района на опытной территории № 5.

Спектр патологических митозов в опытных точках был представлен отставанием хромосом в метафазе и анафазе, мостами в анафазе, трехполюсными митозами. Их соотношение представлено на рис. 1. В контроле 100 % патологий митоза составляли мосты. Микрофотографии указанных нарушений представлены на рисунке 2.

Отмечено влияние места сбора семенного материала на долю клеток на стадиях профазы (сила влияния — 9,0 % ($P < 0,05$)), метафазы митоза (сила влияния — 6,5 % ($P < 0,001$)).

Доля клеток на стадии профазы превышала контрольные значения на препаратах образцов, собранных во всех районах, кроме опытной территории № 3, хотя статистически достоверно только на опытной территории № 5. Максимальное число профазных клеток отмечено на препаратах проростков с опытной территории № 5, минимальное — с опытной территории № 3.

Наименьшее значение количества клеток на стадии метафазы обнаружено в образцах с опытной территории № 5, наибольшее — с территории № 2. Статистически достоверно от контроля отличается по изучаемому цитогенетическому показателю опытная территория № 5.

Влияния места сбора семян на долю клеток на стадиях анафазы и телофазы не выявлено.

В клетках корешков проростков березы повислой встречались ядрышки двух типов — «кора—сердцевина» и «кора—сердцевина с вакуолью» (рис. 3).

Дисперсионный анализ не выявил влияния места сбора семян на уровень ядрышек разных типов, в то время как площадь поверхности одиночных ядрышек в клетках проростков семян достоверно изменялась в районах исследования (сила влияния — 7 % ($P < 0,001$)), аналогичные результаты получены при проведении дисперсионного анализа без учета данных контроля ($P < 0,01$).

Количество ядрышек типа «кора—сердцевина» максимально на препаратах корешков с опытной точки № 1, минимально — с точки № 2; наибольшее количество ядрышек с вакуолью встречалось на образцах со второй, а наименьшее — с первой

Таблица 1.

Цитогенетические характеристики семенного потомства деревьев березы повислой, произрастающих в различных районах г. Старый Оскол

Район	Митотический индекс, %	Патологии митоза, %	Доля клеток на стадиях, %		
			профазы	метафазы	анафазы и телофазы
№ 1	3,1 0,4	4,4 1,8*	6,9 2,4	31,5 4,7	61,7 3,9
№ 2	4,5 0,5* ¹	1,7 0,8	7,6 1,8	44,5 5,4	47,9 5,9
№ 3	3,6 0,4	2,1 0,9	1,1 0,8 ²	38,9 4,2	59,9 4,2
№ 4	3,1 0,3	0,04 0,03	8,5 2,8	41,8 3,0	50,2 3,5
№ 5	5,1 0,4***	5,2 1,2***	11,9 2,9*	25,6 2,0**	60,9 4,2
№ 6	3,8 0,6	4,1 1,8*	7,3 2,4	38,0 4,9 ³	54,8 4,5
контроль	2,7 0,3	0,04 0,03	2,7 1,6	43,6 4,6	53,0 4,3

* — различия с контролем достоверны ($P < 0,05$); ** — различия с контролем достоверны ($P < 0,01$);

*** — различия с контролем достоверны ($P < 0,001$); ¹ — различия с районом № 1 достоверны ($P < 0,05$);

² — различия с районом № 4 достоверны ($P < 0,05$); ³ — различия с районом № 6 достоверны ($P < 0,05$).

Таблица 2.

Характеристики ядрышек семенного потомства деревьев березы повислой, произрастающих в различных районах г. Старый Оскол

Район	Доля ядрышек разного типа, %		Площадь одиночных ядрышек, мкм ²			% клеток на стадии мета-, ана-, телофазы митоза с остаточными ядрышками
	«кора-сердцевина»	«кора-сердцевина» с вакуолью	«кора-сердцевина»	«кора-сердцевина» с вакуолью	Суммарная площадь одиночных ядрышек	
№ 1	87,5 1,6	12,5 1,6	94,6 6,6	115,5 5,8	98,0 6,6	9,4 3,8
№ 2	80,9 2,0 ²	19,1 2,0 ²	114,7 5,0 ¹	134,9 5,3 ²	118,3 4,6 ¹	2,8 1,0
№ 3	81,6 2,3	18,4 2,3	71,0 2,3*** ³	90,4 4,2* ³	74,4 2,5*** ³	7,6 1,7
№ 4	85,4 2,7	14,6 2,7	97,2 2,8	119,6 5,1	107,0 3,2	7,1 2,1
№ 5	83,8 2,2	16,3 2,2	109,3 14,8	131,7 16,1	112,4 14,5	8,2 1,6
№ 6	83,2 1,7	16,9 1,7	108,4 6,0	124,1 8,4	111,2 6,2	10,7 7,7
контроль	86,1 1,9	13,9 1,9	102,8 4,7	119,4 6,9	105,5 4,5	4,8 1,9

* — различия с контролем достоверны ($P < 0,05$); ** — различия с контролем достоверны ($P < 0,01$);

¹ — различия с районом № 1 достоверны ($P < 0,01$); ² — различия с районом № 1 достоверны ($P < 0,05$);

³ — различия с районом № 4 достоверны ($P < 0,001$).

опытной территории (статистически достоверных отличий не выявлено, зафиксирована лишь тенденция к повышению исследуемого показателя).

В образцах, собранных с опытной площади № 3, площадь поверхности ядрышек типа «кора-сердцевина» достоверно отличается от контроля. Для ядрышек типа «кора-сердцевина с вакуолью» достоверны различия с контролем на препаратах с опытных территорий № 2 и № 3. В целом, на

препаратах, изготовленных из корешков проростков семян, собранных в точках №№ 1, 3, 4, площадь всех ядрышек ниже контрольного значения, в остальных случаях отмечена тенденция к повышению.

На препаратах опытных образцов и в контроле встречались остаточные ядрышки на стадии метафазы, анафазы, телофазы митоза (рис. 4). Остаточные ядрышки наблюдались в виде неболь-

ших бугорков (одного или двух) по одну или обе стороны метафазной пластинки (при ее наблюдении сбоку) или же в виде округлых телец, соединенных с метафазной пластинкой нитью. Реже в цитоплазме присутствует не соединенное с метафазой нитью остаточное ядрышко. В анафазе остаточное ядрышко присутствует ближе к полюсу на одной из сестринских групп хромосом. В телофазе его можно видеть как бы в «сидячем» положении на одной из групп хромосом или в свободном состоянии вблизи одного из полюсов клетки. Дисперсионный анализ не выявил влияния места сбора семян на встречаемость клеток с остаточными ядрышками, однако количество клеток с остаточными ядрышками на препаратах проростков семян, собранных во всех районах (кроме № 2) превышает контрольный показатель. Максимальное число таких клеток отмечено на образцах № 6, минимальное — со второй опытной территории.

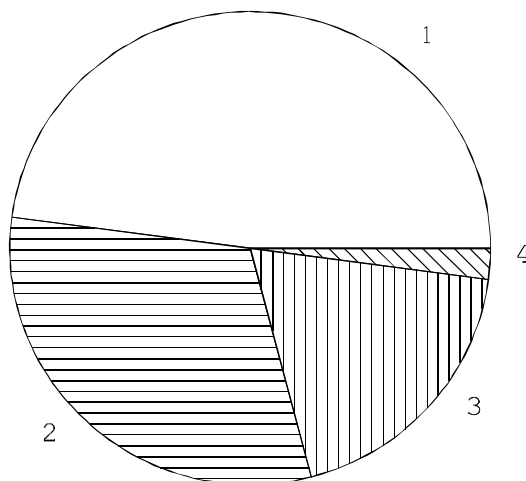


Рис. 1. Спектр патологических митозов в клетках апикальной меристемы проростков семян деревьев березы повислой, произрастающих в различных районах города Старый Оскол

1 — отставание хромосом в метакинезе (47,9 %); 2 — мосты (31,2 %); 3 — отставание хромосом в анафазе (18,8 %); 4 — трехполюсный митоз (2,1 %).

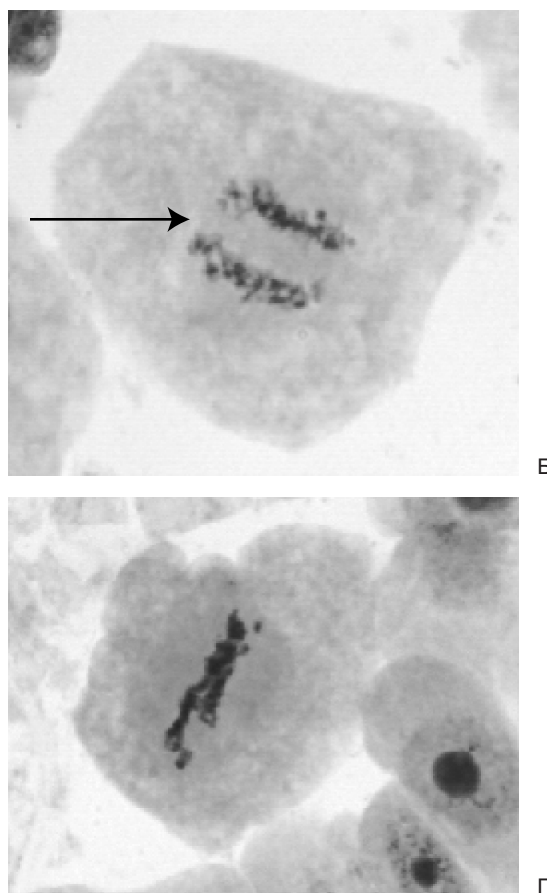
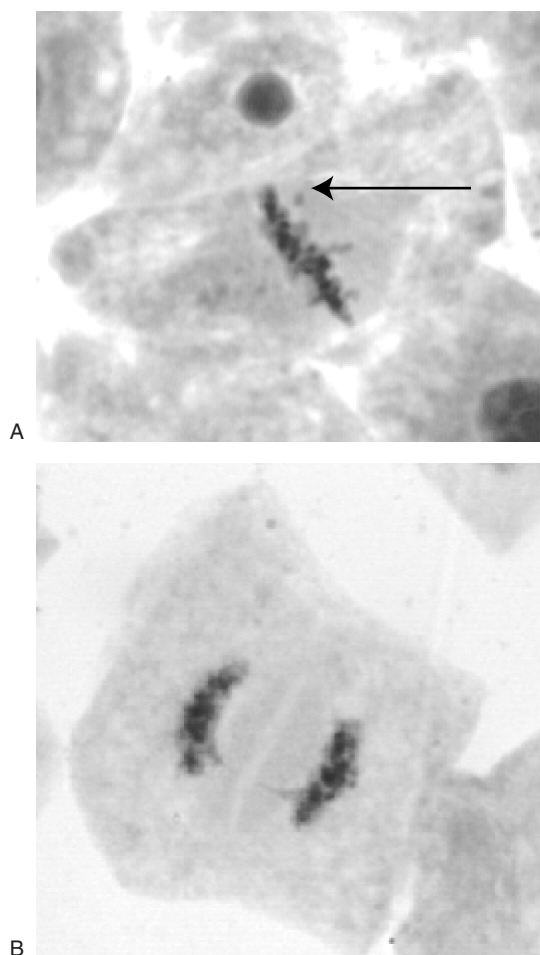


Рис. 2. Нарушения митоза в клетках апикальной меристемы проростков семян деревьев березы повислой, произрастающих в различных районах города Старый Оскол

А - отставание хромосом в метакинезе, Б - отставание хромосом в анафазе, В - мосты в анафазе, Г - трехполюсный митоз.

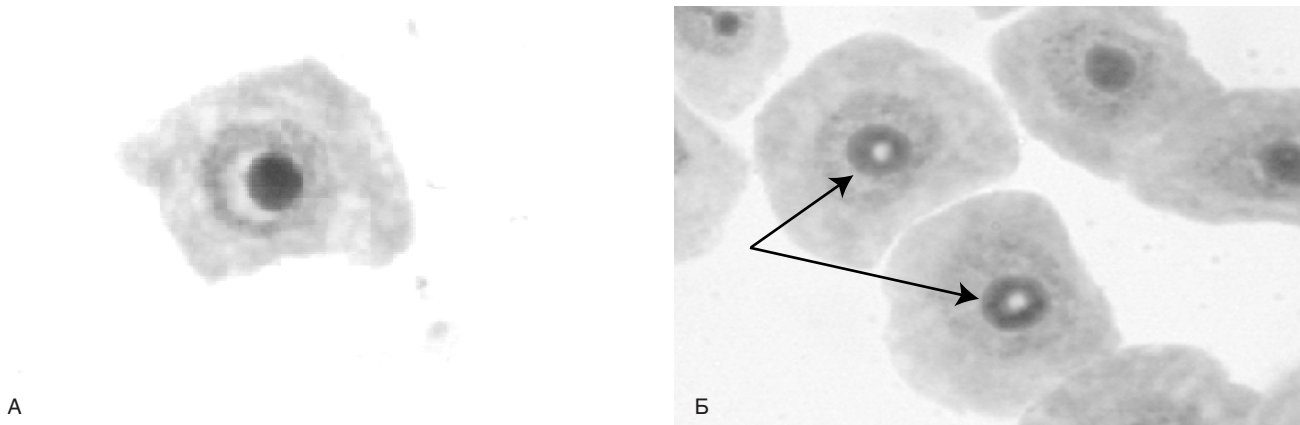


Рис. 3. Ядрышки типа «кора-сердцевина» (А) и «кора-сердцевина с вакуолью» (Б) в клетках апикальной меристемы проростков семян деревьев березы повислой, произрастающих в различных районах г. Старый Оскол

Средняя частота встречаемости клеток с микро-ядрами в течение года в буккальном эпителии детей, проживающих в «чистом» районе, составила $0,16 \pm 0,01$ % (95 %-ный доверительный интервал этого значения — от 0,14 до 0,18 %).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Митотическая активность является важным показателем уровня пролиферации клеток, снижение или возрастание которого может указывать на влияние на изучаемый объект неблагоприятных факторов. Уменьшение митотической активности — сни-

жение числа делящихся клеток — по результатам наших предыдущих исследований [9] проявляется при более значительном стрессовом воздействии, чем увеличение митотической активности — возрастание числа делящихся клеток. В клетках апикальной меристемы проростков семян деревьев, произрастающих на опытных территориях, нами было выявлено повышение митотической активности по сравнению с этим показателем на контрольной территории. Вероятно, это является адаптивной реакцией корневой

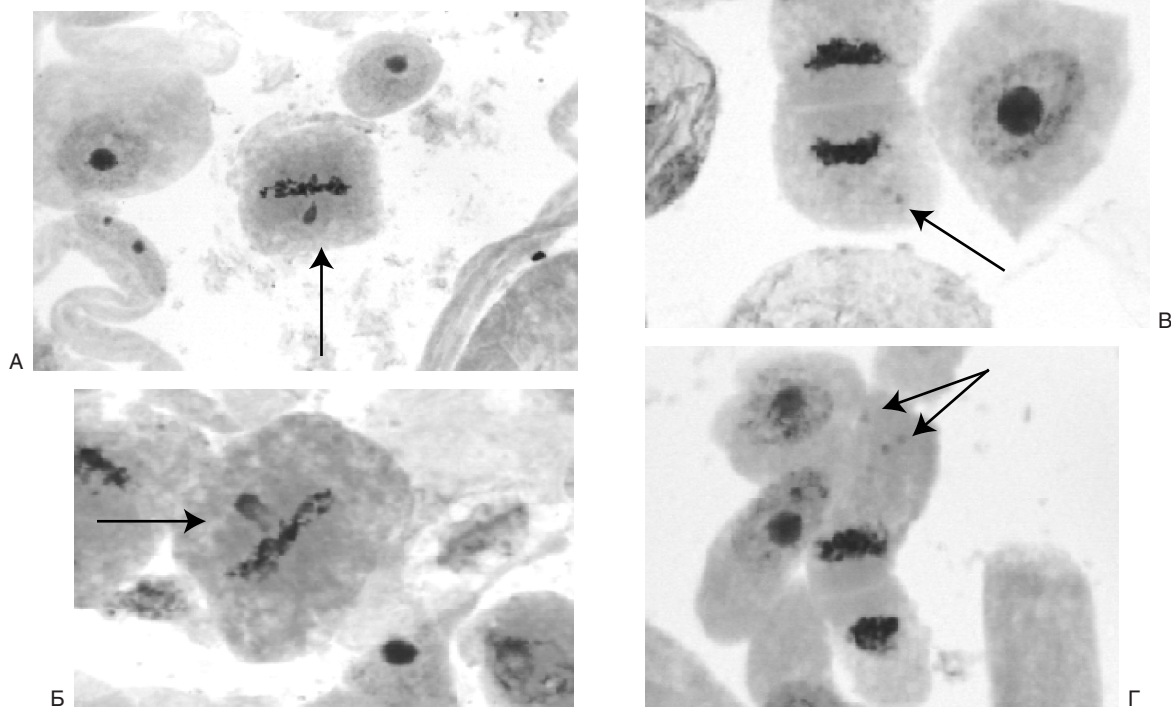


Рис. 4. Остаточные ядрышки на стадии метафазы (А), анафазы (Б), телофазы (В) митоза в клетках апикальной меристемы проростков семян деревьев березы повислой, произрастающих в различных районах г. Старый Оскол

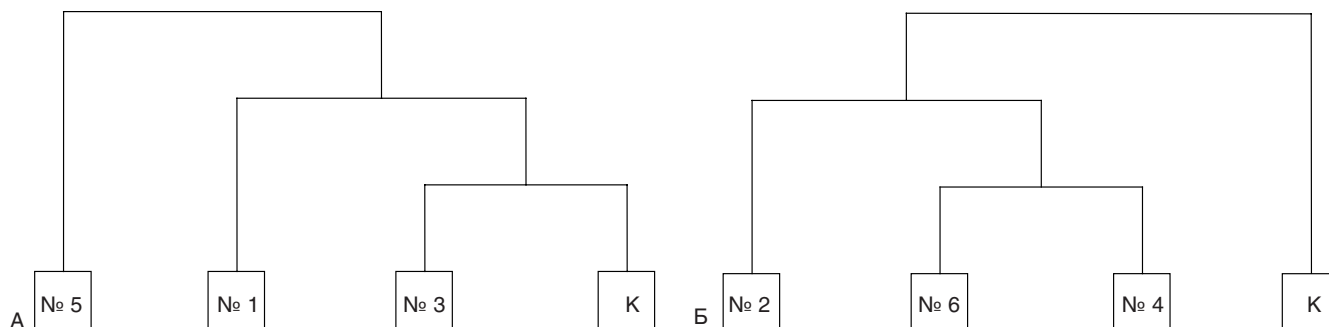


Рис. 5. Дендрограммы кластерных расстояний между опытными территориями и контролем
А – районы № 1, 3, 6 (во дворах) и контроль (К); Б – районы № 2, 4, 5 (у дороги) и контроль (К).

меристемы на возросшую гибель клеток в результате нарушений митоза, то есть происходит компенсация их потерь за счет большего числа делений.

Возрастание митотического индекса осуществляется за счет увеличения числа клеток на стадии профазы. В свете работ Алова [3, 4] это может рассматриваться как явление, обусловленное повреждением хромосом, что препятствует переходу клеток из одной стадии деления в другую.

Возрастание числа патологических митозов на препаратах проростков семян березы повислой на опытных территориях №№ 1, 5, 6 позволило говорить о более сильном их загрязнении. Различий по этому показателю между образцами с опытных территорий у дороги и во дворах не отмечено.

Расширение спектра патологических митозов в клетках апикальной меристемы растительного тест-объекта является одним из показателей, используемых для оценки уровня загрязнения окружающей среды. Ранее нами было выявлено [9], что на препаратах проростков семян, собранных на загрязненной территории, проявляется такой феномен. В наших настоящих исследованиях наблюдается аналогичное явление. Следовательно, можно говорить о неблагоприятной экологической обстановке на опытных территориях.

Характеристики ядрышек — один из наиболее информативных критериев при оценке генетического гомеостаза организма и при выявлении воздействия на организм мутагенов с низкой активностью [6, 9, 34]. Ядрышко — это область ядра, где происходит синтез рРНК. Основными компонентами ядрышка являются: фибриллярные центры (структуры, соответствующие ядрышковым органеллам хромосом), фибриллярный компонент (рибонуклеопротеидные фибриллы $d = 4 - 8$ нм), гранулярные компоненты (рибонуклеопротеидные частицы $d = 10 - 25$ нм), ядрышковые вакуоли, около- и внутриядрышковый хроматин [41].

В клетках корневой меристемы березы повислой встречались следующие типы ядрышек: «кора—

сердцевина» и «кора—сердцевина с вакуолью». Первые являются более функционально активными по сравнению со вторыми. Преобладание доли высокоактивных и уменьшение доли малоактивных и умеренноактивных ядрышек может свидетельствовать о высокой степени стрессового воздействия.

У ядрышек первого типа основными компонентами являются РНП-фибриллы и гранулы, при этом фибриллярный компонент занимает центральную часть, а гранулы образуют непрерывный слой на его периферии. Фибриллярные центры морфологически не выявляются из-за того, что они замаскированы продуктами синтеза рРНК. Ядрышки второго типа имеют вакуоль (светлые зоны внутри, материал которых по структуре не отличается от содержимого нуклеоплазмы) [40].

Увеличение доли клеток с ядрышками типа «кора—сердцевина» без вакуоли и их меньшая площадь по сравнению с таковыми, имеющими вакуоль, свидетельствуют о том, что смена типа ядрышка на высокоактивный может носить компенсаторный характер, поддерживающий высокий уровень биосинтеза клеточных белков в условиях загрязнения [49].

Эту точку зрения подтверждает наличие отрицательной корреляции между долей ядрышек типа «кора—сердцевина» и митотической активностью ($r_s = 0,358$, $P < 0,01$) и положительной — между долей ядрышек типа «кора—сердцевина с вакуолью» и митотической активностью ($r_s = 0,362$, $P < 0,01$).

На опытных образцах и в контроле в клетках апикальной меристемы проростков на стадии мета-, ана-, телофазы митоза встречалось остаточное ядрышко. Ядрышко обычно исчезает в поздней профазе и восстанавливается в телофазе митоза. В условиях стрессового воздействия возможно появление остаточного ядрышка на стадии метафазы, анафазы, телофазы. По данным Таршис и Уманского [35], образование остаточных ядрышек после облучения может рассматриваться как проявление транскрипционной активности генов рДНК. Известно, что метафазные хромосомы в результате их силь-

ной спирализации в метафазе генетически инертны. Действие радиации может привести к нарушению связей ДНК–ДНК и ДНК–белок, изменяя степень конденсации хроматина. При изучении молекулярных механизмов нарушения регуляции транскрипции в облученных клетках Токарской [36] было установлено, что воздействие радиации на клетку приводит к «демаскированию» рибосомных генов и, как следствие, к усилению синтеза предшественника рРНК и более быстрому его созреванию до функционально активной формы. «Демаскирование» рибосомных генов, расположенных в районе ядрышковых организаторов в метафазных хромосомах, — это деконденсация этих районов вследствие нарушения взаимодействия ДНК–белок, что делает такие районы транскрипционно активными.

Впервые остаточные ядрышки на стадии мета-, ана-, телофазы митоза у семенного потомства березы повислой были описаны в условиях значительно антропогенного загрязнения окружающей среды в г. Воронеже [49], и было высказано предположение об адаптивной роли остаточных ядрышек. Ранее остаточные ядрышки на стадии метафазы, анафазы, телофазы митоза были обнаружены у семенного потомства дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) из 30-километровой зоны Чернобыльской АЭС [47], а при проведении дальнейших исследований — на образцах тест-объекта на территориях, подвергающихся значительному антропогенному загрязнению, и на препаратах проростков с экологически «чистой» территории в пики митотической активности [45, 46].

Увеличение на анализируемых образцах с большинства опытных территорий числа клеток с остаточными ядрышками в 1,5–2 раза относительно контроля и наличие положительной корреляции ($r_s = 0,3011$, $P < 0,01$) между этим показателем и количеством патологических митозов, видимо, может являться доказательством загрязненности опытных территорий и свидетельствует об адаптивной роли остаточных ядрышек.

Изменение площади поверхности одиночных ядрышек связано с модификацией транскрипционной активности рибосомальных генов и может рассматриваться как механизм адаптации организма к экстремальным условиям среды [6, 34, 50, 53, 55]. По мнению Архипчука [6], изменение площади поверхности одиночных ядрышек является наиболее чувствительным показателем неблагоприятного воздействия на организм внешних факторов у видов с небольшим числом ядрышкообразующих районов в кариотипе (к таким видам относится береза повислая, в норме для нее характерна одна пара хромосом с вторичными перетяжками [28]). На обследованных территориях в клетках апикальной меристемы про-

ростков происходит изменение площади поверхности одиночных ядрышек по сравнению с контролем, что свидетельствует, по нашему мнению, о неблагоприятной экологической обстановке на изучаемых территориях. Дисперсионный анализ, проведенный без учета контрольных значений, выявил достоверное ($P < 0,01$) влияние места произрастания материнских деревьев *Betula pendula* на площадь поверхности одиночных ядрышек, что указывает на неоднородность загрязнения изучаемых районов города Старый Оскол.

Однако четких тенденций в изменении указанного цитогенетического показателя у проростков семян на опытных площадях не выявляется. По-видимому, эта характеристика является чувствительной в условиях незначительного загрязнения и малоинформативна в случае более сильных воздействий стрессовых факторов среды.

При сравнении площади одиночных ядрышек в клетках апикальной меристемы проростков семян деревьев, произрастающих у дороги и во дворах, отмечены различия в чистом ($P < 0,01$) и среднезагрязненном ($P < 0,05$) районах.

В наиболее загрязненном районе достоверных отличий от контроля по данному показателю не отмечено. Видимо, автомобильные выбросы здесь маскируются общим промышленным загрязнением.

Таким образом, нами выявлено, что в условиях антропогенного загрязнения у семенного потомства березы повислой происходит рост числа делящихся клеток, изменяется время прохождения клетками стадий профазы и метафазы митоза, возрастает число нарушений митоза и расширяется спектр нарушений. Изменяются характеристики ядрышек: уменьшается площадь поверхности одиночных ядрышек, возрастает число клеток с остаточными ядрышками на стадии метафазы — телофазы митоза.

Чтобы дать интегральную оценку загрязнения опытных территорий, необходимо воспользоваться кластерным анализом, который позволяет получить результат, учитывающий сразу несколько цитогенетических показателей. На наш взгляд, этот метод оценки имеет преимущества по сравнению с оценкой загрязнения территории по одному показателю, так как изменения значений той или иной цитогенетической характеристики ограничены ее чувствительностью как к уровню, так, возможно, и к типу загрязнения. Взаимная компенсация этих показателей, приводящая в общем итоге к нормальному результату (канализованность признака), не позволяет дать, используя только один признак, точную оценку загрязнения и построить ее схему. Некоторые авторы [5] пытаются дать интегральную оценку загрязнения путем присвоения определенного бал-

ла, соответствующего вкладу того или иного показателя, опираясь на собственную шкалу. У такого метода анализа есть свои преимущества, так как он позволяет приписывать различную нагрузку тому или иному показателю, выделять главные и подчиненные компоненты. Современные методы кластерного анализа не позволяют проводить подобного рода процедуры. К сожалению, работы по разработке шкалы «критерий—балл» в исследованной нами литературе не встречались, как и не исследовался вопрос по построению схемы загрязнения изучаемого района по совокупности цитогенетических характеристик.

Подобные исследования с использованием кластерного анализа мы осуществляли ранее для оценки антропогенного загрязнения 1-километровой зоны Нововоронежской АЭС [5, 21].

Кластерный анализ проводили отдельно для опытных площадей во дворах (№№ 1, 3, 5 и контроль) и у дороги (№№ 2, 4, 6 и контроль). Дендрограммы кластерных расстояний представлены на рис. 5. В результате было выявлено, что наименьшее кластерное расстояние между контролем и опытной точкой № 3, наибольшее — между контролем и точкой № 5, промежуточное положение занимает опытная территория № 1 (среднезагрязненный район).

Для опытных территорий у дороги (№ 2, 4, 6) оказалось, что дальше всех от контроля отстоит участок № 2 в среднезагрязненном районе, а промежуточное положение между ним и чистым районом № 4 занимает наиболее загрязненный № 6.

Таким образом, можно говорить, что наиболее загрязненными, по результатам цитогенетических исследований, являются опытные территории — №№ 2 и 5, самыми чистыми опытные площади — №№ 3 и 4.

Для прогноза генотоксичности окружающей среды для человека мы воспользовались формулой (1) и получили для опытных территорий следующие результаты: № 1 — уровень микроядер — 0,27 %; № 2 — 0,43 %; № 3 — 0,17 % (это значение близко к полученному в опыте — 0,16 % и входит в его 95 %-ный доверительный интервал), № 4 — 0,29 %, № 5 — 0,39 %; № 6 — 0,38 %. Таким образом, возможно говорить об адекватности разработанной нами математической модели экстраполяции данных цитогенетических показателей семенного потомства березы повислой на человека.

Сравнение значений вышеперечисленных цитогенетических показателей не выявило в большинстве случаев достоверных различий между исследуемыми образцами, собранными на опытных площадках у дороги и во дворах, а также определенной тенденции в их изменении при сравнении этих площадок, поэто-

му можно предположить, что основной вклад в модификацию цитогенетических характеристик вносит промышленное загрязнение. Указанный факт можно объяснить слабой интенсивностью движения автотранспорта по городским магистралям, значительной шириной улиц (они постоянно продуваются ветром и таким образом очищаются). Итак, разница в загрязнении выхлопными газами автотранспорта территорий у дорог и во дворах в некоторой степени нивелируется вследствие вышеперечисленных обстоятельств, а также, возможно, что основное загрязнение окружающей среды обусловлено выбросами промышленных предприятий, а автотранспорт лишь незначительно дополняет это загрязнение.

На основании результатов проведенной работы мы предлагаем использовать цитогенетические показатели березы повислой (митотическую активность, патологии митоза и их спектр, характеристики ядрышек) для оценки антропогенного загрязнения окружающей среды.

Также имеет смысл использовать комплекс цитогенетических характеристик для оценки загрязнения окружающей среды и проводить такого рода оценку с использованием методов кластерного анализа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых российских ученых и ведущих научных школ РФ «Цитогенетические реакции древесных растений (на примере лиственных) на стрессовые условия, обусловленные антропогенным загрязнением и оценка генотоксичности окружающей среды для человека по цитогенетическим показателям древесных растений» (грант МК–2587.2004.4).

Выражаем благодарность зав. кафедрой анатомии и физиологии человека и животных Белгородского государственного университета, профессору Е. А. Липуновой и доценту М. Ю. Скоркиной за предоставленную возможность работы с системой «ВидеоТесТ».

Литература

1. Абрамов В. А., Шевченко В. А. Генетические последствия хронического действия ионизирующих излучений на популяции // Радиационный мутагенез. М.: Наука, 1987. — С. 83–109.
2. Аксенов Н. Я., Аксенов В. И. Транспорт и охрана окружающей среды. М.: Транспорт, 1986. — 176 с.
3. Алов И. А. Патологии митоза // Вест. АМН СССР. 1965. — № 11. — С. 58–66.
4. Алов И. А. Проблемы патологии митоза // Цитология. М.: Наука, 1976. — Т. 3. — С. 40–66.

5. Артюхов В. Г., Калаев В. Н., Сенькевич Е. В. и др. Цитогенетические показатели семенного потомства листовых древесных растений в 1-километровой зоне Нововоронежской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. — Т. 44. — № 4. — С. 445–457.
6. Архипчук В. В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика. 1995. — Т. 29. — № 3. — С. 6–12.
7. Бессонова В. П., Грицай З. В., Юсыпова Т. И. Использование цитогенетических критериев для оценки промышленных поллютантов // Цитология и генетика. 1996. — Т. 30. — № 5. — С. 70–76.
8. Бондарь Л. М., Частокотенко Л. В. Цитогенетический подход к оценке популяции растений при экологическом мониторинге // На путях к духовно-экологической цивилизации. Томск, 1996. — С. 117–119.
9. Буторина А. К., Калаев В. Н. Анализ чувствительности различных критериев цитогенетического мониторинга // Экология, 2000. — № 3. — С. 206–210.
10. Буторина А. К., Калаев В. Н., Карпова С. С. Особенности протекания митоза и ядрышковые характеристики семенного потомства березы повислой в условиях антропогенного загрязнения // Цитология, 2002. — Т. 44. — № 4. — С. 392–399.
11. Буторина А. К., Калаев В. Н., Карпова С. С. Цитогенетические нарушения в соматических клетках человека и березы повислой в районах г. Воронежа с различной интенсивностью антропогенного загрязнения // Экология, 2002. — № 6. — С. 438–441.
12. Буторина А. К., Косиченко, Н. Е., Щетинкин С. В. Цитогенетический мониторинг среды в зоне потенциальной опасности и радиационного загрязнения // Генетика, 1994. — Т. 30. — Приложение. — С. 23.
13. Гераськин С. А., Зимина Л. М., Дикарев В. Г. и др. Сравнительный анализ методами биоиндикации антропогенного загрязнения района расположения предприятия по переработке и хранению радиоактивных отходов из 30-км зоны Чернобыльской АЭС // Экология, 2000. — № 4. — С. 300–303.
14. Гуськов Е. П., Вардуни Т. В., Шкурят Т. П. и др. Свободно радикальные процессы и уровень аберраций хромосом в листьях древесных растений как тест-системы на генотоксичность городской среды // Экология, 2000. — № 4. — С. 270–275.
15. Демьянов А. В. Ценогенетическая роль *Pinus sylvestris* L. в местных сообществах Кольского Севера в условиях техногенного загрязнения // Изв. АН. — Сер. биол. 1992. — № 1. — С. 52–58.
16. Доклад о состоянии окружающей среды Воронежской области в 2003 г. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2004. — 183 с.
17. Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. М.: Наука, 1978. — 130 с.
18. Духарев В. А., Духарева А. В., Минаев И. М. Хвойные как тест-системы на мутагенность окружающей среды // Докл. АН СССР, 1988. — Т. 298. — № 3. — С. 742–745.
19. Ефимов Г. А., Ларкин Ю. М. Транспорт и окружающая среда. М.: Знание, 1975. — 60 с.
20. Иванов В. Н., Сторчевус В. К. Экология и автомобилизация. Киев: Будивельник, 1990. — 128 с.
21. Калаев В. Н. Цитогенетический мониторинг загрязнения окружающей среды с использованием растительных тест-объектов: Автореф. дис. канд. биол. наук. — Воронеж, 2000. — 25 с.
22. Калаев В. Н., Буторина А. К., Карпова С. С. Оценка генотоксичности окружающей среды для человека по показателям растительных тест-объектов // Актуальные проблемы медицины и биологии. Сборн. науч. работ. — Вып. 2. — Томск: Сиб. гос. мед. ун-т. — 2003. — С. 57–58.
23. Карпова С. С., Калаев В. Н., Артюхов В. Г. и др. Использование морфологических характеристик ядрышек клеток корней проростков березы повислой для определения степени загрязнения окружающей среды // Изв. РАН. — Сер. биологическая, 2006. — № 1. — С. 86–94.
24. Косиченко Н. Е. Влияние генотипа-среды на формирование микроструктуры стебля и диагностика технических свойств, роста устойчивости древесных растений: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. : Воронеж, 1999. — 40 с.
25. Крышев И. И., Алексахин Р. М., Рябов И. Н. и др. Радиоактивное загрязнение районов АЭС. М.: Ядерное общество СССР, 1990. — 150 с.
26. Кулачев А. П. Методы и средства анализа данных в операционной среде Windows. Stadia 6.0. М.: Информатика и компьютеры, 1996. — 257 с.
27. Лесная энциклопедия / Под. ред. Воробьева Г. И., Анушина Н. А., Атрохина В. Г. и др. М., 1985. — Т. 1. — С. 286–290, 508.
28. Макарова Т. П. Сравнительный кариологический анализ березы повислой и пушистой в центральной части Южной тайги: Автореф. дис. канд. биол. наук. — М., 1989. — 24 с.
29. Нерсисян А. К., Зильфян В. Н., Кумкумаджян В. А. и др. Анализ микроядер в слюистой ротовой полости онкологических больных для оценки кластогенного эффекта химиопрепаратов // Цитология и генетика, 1993. — Т. 27. — № 1. — С. 77–81.
30. Онуцин А. А., Козлова А. А. Структурно-функциональные изменения хвой сосны под влиянием поллютантов в лесостепной зоне Средней Сибири // Лесоведение, 1994. — № 2. — С. 39–45.
31. Осколков В. А. Состояние репродуктивного процесса сосны обыкновенной в условиях лесов Верхнего Приангарья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Красноярск, 1998. — 23 с.
32. Подольский В. П., Артюхов В. Г., Турбин В. С., Канищев А. Н. Автотранспортное загрязнение придорожных территорий. — Воронеж: Воронежский государственный университет, 1999. — 264 с.
33. Романовский М. Г. Череззерница шишек семян сосны обыкновенной вблизи автодорог // Лесоведение. 1992. — № 2. — С. 71–74.
34. Соболев М. А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды // Цитология и генетика. — 2001. — Т. — 35. — № 3. — С. 72–84.
35. Таршиш М. А., Уманский С. Р. Живая клетка. — М.: Атомиздат, 1971. — 907 с.
36. Токарская В. И. Молекулярные механизмы нарушения регуляции транскрипции в облученных клетках // Влияние радиации на регуляторные процессы в клетке: тез. докл. всесоюзного симпозиума. — Пушкино, 1976. — С. 5–6.
37. Тихомирова Ф. А., Щеглов А. И., Малихин С. В. и др. Радиационный мониторинг леса // 1-ый Всесоюзный радиобиологический съезд. — Москва, 21–27 авг. 1989: тез. докл. Пушкино, 1989. — Т. 2. — С. 538–539.
38. Федорков А. Л. Половая репродукция сосны обыкновенной при аэротехногенном загрязнении в условиях Субарктики // Лесной журнал. — 1992. — № 4. — С. 60–64.
39. Федорова А. И., Шестопалова В. В. Изучение устойчивости некоторых хвойных пород к выбросам автотранспорта // Проблемы интродукции и экологии Центрального Черноземья: Сб. науч. тр. Воронеж, 1997. — С. 29–30.

40. Челидзе П. В., Зацепина О. В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии. 1988. — Т. 105. — Вып. 2. — С. 252–268.
41. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию, М.: Академкнига, 2004. — 493 с.
42. Чувашина Н. П. Изготовление временных препаратов // Цитологические исследования плодовых и ягодных культур / Под ред. Г.А. Курсакова. Мичуринск: Пролетарский светоч, 1976. — С. 52–67.
43. Экологический мониторинг. Методы биомониторинга // Под ред. Д.Б. Гелашивили. Н. Новгород: ННГУ, 1995. — Ч. 2. — 272 с.
44. Эрн А., Раук Ю. Хвойные деревья — индикатор техногенной нагрузки в промышленном ландшафте // Изв. АН ЭССР. — Сер. биол. — 1986. — Т.35. — № 2. — С. 131–141.
45. Butorina A. K., Kalaev V. N. Diversity of Cytological Characteristics in Oak Under Normal Conditions // Diversity and Adaptation in Oak Species. Proceedings of a conference of IUFRO Working Party 2.08.05 held Oct. 12–17, 1997, College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, U.S.A. Pennsylvania, 1998. — P. 46–48.
46. Butorina A. K., Kalaev V. N., Najdenova O. S. et al. Relationship between cytogenetic anomalies in forest trees subjected to radioactive contamination and industrial pollution with inherent defects in human infants in Central Russia // Forest Genetics (special issue «Cytogenetic Studies of Forest Trees and Shrubs — Review, Present Status, and Outlook on the Future»). Zvolen, 2000. — P. 35–41.
47. Butorina A. K., Kosichenko N. E., Isakov Y. N. et al. The effects of irradiation from the Chernobyl nuclear power plant accident on the cytogenetic behaviour and anatomy of trees // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb, 1997. — P. 211–226.
48. Druskovic B. Cytogenetic bioindication of air pollution in Slovenia 1985–1982 // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb, 1997. — P. 227–240.
49. Kalaev V. N., Karpova S. S. The influence of air pollution on cytogenetic characteristics of birch seed progeny // Forest Genetics. 2003. — V.10. — № 1. — P. 11–18.
50. Meyers M. B., Spengler B. A., Chang T. D., Biedler J. L. Gene amplification-associated cytogenetic aberrations and protein changes in vincristine-resistant Chinese hamster, mouse and human cells // J. Cell Biol. 1985. — V. 100. — P. 588–597.
51. Micieta K., Murin G. The use of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus nigra* Arnold. as bioindicator species for environmental pollution // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb, 1997. — P. 253–263.
52. Muller M., Geiszinger A., Grill D. Effects of increased ozone on the somatic chromosomes of Norway spruce (*Picea abies*) trees // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb, 1997. — P. 265–274.
53. Scotto K. W., Biedler J. L., Melera P. W. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells // Science. 1986. — V. 232. — P. 751–755.
54. Sparrow A. N., Wodwell G. M. Prediction of the sensibility of plants to chronic gamma - irradiation // Radioecology. 1963. — № 4. — P. 257.
55. Stahl F., Martinsson F., Dahllof B., Levan G. Amplification and overexpression of the P-glycoprotein genes and differential amplification of three other genes in SEWA murine drugresistant cells // Hereditas. 1988. — V. 108. — H. 2. — P. 251–258.
56. Zujeva G. V., Babushkina L. G., Makhniova S. Chromosomal anomalies in *Pinus sylvestris* L. seeds germinated under polluted air conditions // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb, 1997. — P. 285–294.

