



ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ПОПУЛЯЦИЯХ НАЗЕМНЫХ МОЛЛЮСКОВ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ЛАНДШАФТОВ СРЕДНЕРУССКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ¹

**Э.А. Снегин,
Е.С. Ненашева,
О.Ю. Артемчук**

Белгородский государственный
национальный
исследовательский
университет; Россия, 308015,
г. Белгород, ул. Победы 85
E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) была оценена степень повреждения ядерной ДНК в популяциях наземных моллюсков *Bradybaena fruticum* Müll. и *Chondrula tridens* Müll., *Seraea vindobonensis* Fer., обитающих в условиях лесостепного ландшафта юга Среднерусской возвышенности. Выявлена тенденция в увеличении доли поврежденной ДНК у моллюсков, как в антропогенно-измененных, так и в естественных биотопах. Отмечается возрастная динамика степени повреждения генетического аппарата.

Ключевые слова: наземные моллюски, повреждение ДНК, метод ДНК-комет.

Введение

Одним из пагубных воздействий, которое оказывает человек на окружающее пространство, является преднамеренное или непреднамеренное внесение в естественные сообщества генотоксичных ксенобиотиков, вызывающих изменение структуры или разрушение ДНК живых организмов. Последствия таких влияний предсказать сложно, т.к. дезорганизация наследственного аппарата может вызвать цепные реакции саморазрушения биоты, причем самому человеку здесь отводится роль страдающей стороны. В этой связи весьма востребованными оказываются методы, диагностирующие степень насыщения среды мутагенными компонентами.

На сегодняшний день весьма чувствительным методом для оценки генотоксичности различных веществ и материалов является метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет, Comet assay [1, 2]), который, судя по публикациям, все больше используется в различных лабораториях в тестах *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, постепенно появляются сведения о применении этого метода для определения степени мутагенной нагрузки в различных ландшафтах. В последнем случае встает вопрос о приемлемых организмах, которые могли бы выполнять биоиндикационную функцию.

В качестве объектов исследования нами были выбраны наземные моллюски, являющиеся биоиндикаторами антропогенного воздействия на биоценозы *Bradybaena (Fruticicola) fruticum* Müll. (кустарниковая улитка) и *Chondrula tridens* Müll., (улитка трехзубая). Кроме того, были проанализированы особи из двух популяций особо охраняемого вида *Seraea vindobonensis* Fer (улитка австрийская).

Выбор этих моллюсков не случаен. Названные виды обладают ярко выраженным полиморфизмом конхиологических и биохимических признаков, образуют многочисленные колонии, широко распространены на европейском континенте. В этой связи эти улитки уже давно используются как объект мониторинга различных урбанизированных территорий. Немаловажным является и то, что кустарниковая и австрийская улитки являются относительно долгоживущим (до 5 лет) и малоподвижными животными, привязанными своей биологией к определенной растительности и почвам. Все это способствует накоплению в их теле различных поллютантов, включая и генотоксичные компоненты.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке программы Министерства образования и науки РФ ГК П 1050.



Материал и методика

Работа проводилась в летний сезон 2011 года. Улитки собирались вручную в местах обитания. Для сбора *Ch. tridens* применялся метод кошени сачком. Из каждой популяции отбиралось по десять особей для лабораторных исследований. Анализировались в основном половозрелые моллюски, закончившие рост, о чем свидетельствовал отворот устья на раковине. Описание пунктов сбора приводится в таблице 1.

Таблица 1

Описание пунктов сбора

Пункт	Описание биотопа	Координаты
1	Памятник природы «Ясный колодец», пойма р. Короча, окрестности г. Короча. Опушка черноольшанника.	50°49'34.23" С.Ш. 37°12'34.24" В.Д.
2	Пойма р. Корень, окрестности пос. Алексеевка (Корочанский район). Заросли ивы.	50°45'19.01" С.Ш. 37°01'30.91" В.Д.
3	Пойма р. Пена, окрестности пос. Сырцево (Ивнянский район). Заросли ивы и клена.	50°53'48.79" С.Ш. 36°15'32.43" В.Д.
4	Пойма р. Нежеголь, территория г. Шебекино. Ивовый лес.	50°24'32.93" С.Ш. 36°52'38.38" В.Д.
5	Пойма р. Северский Донец, окрестности г. Белгород. Заросли ивы и клена.	50°36'38.40" С.Ш. 36°37'19.19" В.Д.
6	Заповедный участок «Стенки-Изгорья», долина р. Оскол, окраина черноольшанника (Новооскольский район).	50°41'22.60" С.Ш. 37°49'12.67" В.Д.
7	Пойма р. Ворскла, территория пос. Борисовка, под автомобильным мостом.	50°36'32.25" С.Ш. 36°00'21.33" В.Д.
8	Пойма р. Осколец, окрестности д. Стойло, территория Стойленского ГОК (Губкинский район), заросли ивы.	51°17'24.75" С.Ш. 37°44'05.57" В.Д.
9	Рекультивированные отвалы Стойленского ГОК (точка 1, Губкинский район).	51°17'18.18" С.Ш. 37°40'56.29" В.Д.
10	Рекультивированные отвалы Стойленского ГОК (точка 2, Губкинский район).	51°17'04.37" С.Ш. 37°42'59.01" В.Д.
11	г. Белгород, газон возле 1-го корпуса БелГУ, посадки каштанов и елей.	50°37'16.58" С.Ш. 36°34'36.25" В.Д.
12	Заповедный участок «Стенки-Изгорья», меловой склон на северной окраине, долина р. Оскол (Новооскольский район).	50°41'24.42" С.Ш. 37°49'34.22" В.Д.
13	Долина р. Валуй, подножие мелового склона, окрестности г. Валуйки, рядом с автомобильной трассой.	50°13'24.38" С.Ш. 38°00'34.61" В.Д.
14	Памятник природы «Бекаряковский бор», пойма р. Нежеголь (Шебекинский район), заросли клена американского и меловой склон вблизи автомобильной трассы.	50°25'43.87" С.Ш. 37°04'12.07" В.Д.

Метод ДНК-комет. Для анализа использовали ткань гепатопанкреаса. Мацерация проходила в фосфато-солевом буфере (рН 7.5) содержащем 20 mM EDTA-Na₂ и 10% ДМСО при температуре +4° С. Клеточные суспензии в составе легкоплавкой агарозы наносили на предметные стекла с агарозной подложкой при температуре + 42° С. Лизис белков проходил два часа при температуре +4° С (лизирующий буфер: 10 mM Tris-HCl (рН 10), 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1% Triton X-100 и 10% ДМСО). Электрофорез проводили в темном помещении с использованием трис-ЭДТА -боратного буфера (рН 8.9; 20 мин.; 1 в/см). Фиксированные спиртом и высушенные препараты окрашивали красителем SYBR Green I. Анализ изображений проводился на эпифлуоресцентном микроскопе. Данные обрабатывались при помощи программы CometScore™. Ядра ранжировались по четырем стадиям разрушения ДНК. На каждом препарате учитывалось не менее 100 ядер (рис. 1).

Степень поврежденности ДНК мы оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса, который иногда выражается как индекс «ДНК-комет» (ИДК), по формуле:

$$\text{ИДК} = (n_0n + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

где n₀-n₄ — число «ДНК-комет» каждого типа, Σ — сумма подсчитанных «ДНК-комет» [3].

Кроме того, для расчетов был использован непараметрический критерий Даннета («% ДНК в хвосте» [4, 5, 6, 7]), а так же высчитывался процент клеток, находившихся в состоянии апоптоза.

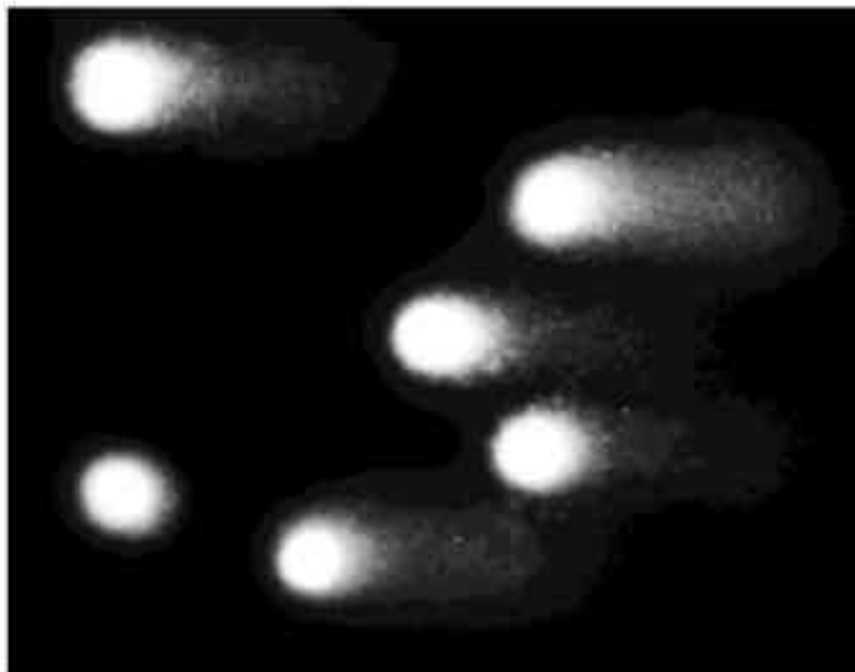


Рис. 1. Изображение ДНК-комет клеток гепатопанкреаса *Br. fruticum* (на фотографии видны ядра на различных стадиях разрушения)

Полученные результаты и обсуждение

Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели разрушения ДНК в исследуемых группах моллюсков

Вид	Пункт	Проанализировано клеток	Количество ДНК-комет	ИДК	% ДНК в хвосте	% апоптических клеток
<i>Br. fruticum</i>	1	2344	31	0.01	5.6±0.9	0
	2	1727	33	0.02	5.9±1.5	0
	3	1594	452	0.27	6.9±0.4	4.3
	4	1964	102	0.07	5.3±0.6	0.7
	5	1528	114	0.10	6.4±0.6	0
	6	2188	243	0.35	11.1±0.7	0
	7	1514	192	0.16	7.1±0.7	0
	8	1441	128	0.14	8.7±0.7	0
<i>Ch. tridens</i>	9	1555	101	0.10	10.3±0.9	0
	10	1449	108	0.15	11.3±1.1	0
	11	1154	129	0.22	7.7±0.7	0
	12	1061	110	0.13	7.6±0.9	0
<i>C. vindobonensis</i>	13	1141	105	0.30	9.3±1.1	5.0
	14	1634	74	0.12	8.6±1.2	9.0

Согласно полученным данным, несмотря на сильную урбанизацию района исследования, уровень разрушения ДНК в исследуемых группах моллюсков можно считать незначительным, т.к. полученные средние показатели ИДК не достигают даже первой стадии разрушения. Это с одной стороны говорит об отсутствии в пунктах сбора сильных повреждающих факторов, обладающих генотоксичным эффектом, а с другой стороны демонстрирует активные репарационные и гомеостатические процессы, протекающие в организме животных, нейтрализующих отрицательные воздействия



средовых компонентов. Тем не менее, определенные тенденции в направлении увеличения количества разрушенной ДНК по нашим данным прослеживаются.

В частности, результаты демонстрируют увеличение степени повреждения ДНК в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов (пункты 8, 9, 10), вблизи автомобильных дорог (пункты 7, 13, 14), в условиях города (пункты 5, 11) а также в естественных сообществах, расположенных недалеко от сельскохозяйственных угодий (пункты 3, 6). Так, в заповедном участке Стенки Изгорья (пункт 6), несмотря на охранной статус и отсутствие вблизи промышленных производств, отмечено самое высокое для района исследования значение ИДК (0,35) и относительно большой процент ДНК в хвосте (11,1). Такой неожиданный эффект, вероятно, вызван следующими причинами. Дело в том, что непосредственно к охранной зоне заповедника примыкают пшеничные поля, занимающие водораздельные участки, откуда в результате летних ливневых дождей в окрестные понижения рельефа происходит смыв удобрений и пестицидов. Улитки (*Br. fruticum*), обитая в таких низинных участках на территории заповедника, вероятно, получают повышенные дозы токсикантов. Примечательно, что у другого вида *Ch. tridens*, обитающего так же на территории заповедника (пункт 12), но предпочитающего меловые склоны, столь относительно сильного увеличения ИДК не наблюдается. Аналогичную картину увеличения доли разрушенной ДНК мы наблюдаем так же в долине реки Пена (пункт 3), куда с окрестных огородов и полей, вероятно, так же происходит поступление токсичных компонентов. Безусловно, этот вывод требует определенной доли осторожности и диктует необходимость более тщательного изучения этого явления с использованием химического анализа почвы, растений и тканей животных. Наиболее «чистыми» по нашим данным оказались участки поймы рек Корень и Короча (пункты 1, 2).

Кроме того, нами зафиксированы достоверные отличия долей поврежденной ДНК у молодых и взрослых особей *Br. fruticum* в пункте 3 (табл. 3). Данный факт можно объяснить либо кумулятивным эффектом, либо естественными возрастными изменениями в структуре и функционировании клеток организма, приводящими к разрушению части ядерной ДНК (хотя последнее так же может быть связано с постепенным накоплением в теле моллюска токсичных компонентов). Полагаем, что это явление нужно учитывать при сопоставлении полученных результатов из разных пунктов, используя данные только по одновозрастным группам животных.

Таблица 3

Показатели разрушения ДНК у особей *Br. fruticum* в группе «Сырцево» (пункт 3)

Условный возраст животного	№ животного	Проанализировано клеток	Индекс ДНК-комет	% ДНК в хвосте
Молодые (раковина менее 3-х оборотов)	1	211	0	0
	2	190	0	0
	3	125	0	0
	4	130	0	0
Взрослые (раковина более 5-ти оборотов)	5	128	1.086	8.46
	6	188	0.008	8.23
	7	108	0.336	6.82
	8	198	0.61	5.7
	9	166	0.505	6.906
	10	150	0.137	6.55

Список литературы

1. Ostling O., Johanson K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1984. – Vol. 123, №. 1. – P. 291–298.
2. Olive P. L, Banath J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // Nature Protocols. – 2006. – №1. P. 23–29.

3. Struwe M., Greulich K. O., Suter W., Plappert-Helbig U. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro // *Mutation Research*. – 2007. – Vol. 632, Iss. 1-2. – P. 44–57.

4. Chaubey R. C. Computerized image analysis software for the comet assay // *Methods in Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 291. – P. 97–106.

5. Francesconi A., Del Terra E., Meli A., Ambesi-Impiombato F. S. Standardization of the comet assay technique on FRTL5 cells // *Physical Medicine*. – 2001. – Vol. 17, Iss. 1. – P. 232–234.

6. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность. Методические указания. – Вильнюс, 1989. – 35 с.

7. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. – М., 2006. – 27 с.

ESTIMATION OF EXTENT OF DAMAGE OF DNA IN POPULATIONS OF TERRESTRIAL MOLLUSKS OF THE URBANIZED LANDSCAPES OF MID-RUSSIA UPLAND

**E.A. Snegin,
E.S. Menasheva,
O.Y. Artemchuk**

*Belgorod State National Research
University, Pobedy St., 85, Belgorod,
308015, Russia
E-mail: snegin@bsu.edu.ru*

By method of alkaline gel electrophoresis of isolated cells (Comet assay) *the* extent of damage to nuclear DNA in populations of terrestrial mollusks *Bradybaena fruticum* Müll., *Chondrula tridens* Müll. and *Cepaea vindobonensis* Fer. living in the forest-steppe landscape of the south of Central Russian Uplands *was estimated*. The tendency in increasing the proportion of damaged DNA in mollusks in anthropogenic-changed as well as in natural biotopes is revealed. There is the age dynamics in the degree of damage of the genetic apparatus.

Key words: terrestrial mollusks, DNA damage, Comet assay.