

**ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ
МОНИТОРИНГА ЭСТУАРНОЙ ЗОНЫ РЕК РАЗДОЛЬНОЙ И
АРТЕМОВКИ (ПРИМОРСКИЙ КРАЙ)**

В.В. Слободскова, Е.Е. Солодова, В.П. Челомин

*Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева ДВО РАН,
ул. Балтийская, 43, Владивосток, 690041, Россия. E-mail: slobodskova@poi.dvo.ru*

В работе представлены результаты исследования по выявлению генотоксичности среды обитания *Corbicula japonica* населяющей реки Раздольная и Артемовка. Для выявления генотоксических эффектов был использован метод ДНК - комет. Выяснено, что моллюски, обитающие в акватории р. Раздольная находятся под влиянием антропогенного загрязнения, т.к. 1/3 молекулы ДНК жаберных клеток *C. japonica* имеет ярко выраженные деструктивные изменения.

**APPLICATION OF GENOTOXIC ANALYSIS FOR MONITORING
OF ESTURY OF THE RAZDOLNAYA AND ARTEMOVKA
RIVERS (PRIMORYE TERRITORY)**

V.V. Slobodskova, E.E. Solodova, V.P. Chelomin

*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, 43 Baltiyskaya Str., Vladivostok, 690041,
Russia. E-mail: slobodskova@poi.dvo.ru*

The paper presents the results of the study to identify genotoxicity environment of *Corbicula japonica*, that inhabiting the estuary of the Razdolnaya and Artemovka river. To reveal of the genotoxic effects we used the comet assay. Found that molluscs inhabiting under the influence of anthropogenic pollution, as 1/3 of the genome of gill cells of *C. japonica* has a pronounced destructive changes.

В настоящее время пристальное внимание привлекает проблема возрастающего поступления токсичных веществ в окружающую среду и последствия их воздействия на биоту. Значение загрязнения прибрежных акваторий обусловлено негативным влиянием ксенобиотиков на гидробионтов, действие которых проявляется только после их поглощения и накопления клеточными структурами организма. На сегодняшний день уже известно достаточное количество фактов нарушения структуры биоценозов и популяций, поведенческих реакций, физиологических функций и множественных патологий особей из сред с хроническим загрязнением. В основе подобных реакций лежат биохимические изменения на субклеточном

и молекулярном уровнях. Именно на последнем и происходят изменения, которые определяют выживание организма.

Некоторые химические агенты, присутствующие в окружающей среде, или физические факторы классифицируются как генотоксиканты и обладают способностью взаимодействовать с молекулами ДНК, индуцируя повреждения в структуре, которые приводят к дезорганизации клеточных процессов, и нарушению функционирования биологической системы. Эти, патологические, изменения можно зарегистрировать ранее, чем они проявятся на уровне популяций и экосистем, с помощью метода ДНК-комет (Comet assay, SCGE). Кометный анализ, представляет собой относительно простой, быстрый и чувствительный метод определения повреждений в молекуле ДНК индивидуальной клетки. Важной особенностью метода является его способность исследовать поврежденность генома на ранних стадиях нарушения биологической целостности. Он основан на электрофорезе ДНК единичных клеток в постоянном электрическом поле. Наблюдаемый геном представлен в виде электрофоретического следа, длина которого и доля ДНК в нем пропорциональны повреждению ДНК в клетке (Тронов, 1996).

Ранее метод применялся только в медицинских исследованиях на клетках млекопитающих, но в середине 90-х гг. стал широко использоваться в экологическом мониторинге (Nacci et al., 1996; Mitchelmore et al., 1998; Shugart, 2000; Regoli et al., 2004; Mitchelmore C.L. et al., 2004).

Цель нашей работы – выявление степени повреждения молекулы ДНК жаберных клеток двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* обитающего в реках Раздольная и Артемовка при помощи метода ДНК-комет (Comet assay, SCGE).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали половозрелых особей (размер 30–34 мм) эстуарного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica*. Вид распространен в Японском море от Восточно-Корейского залива до западного побережья Сахалина. Обитает в со-

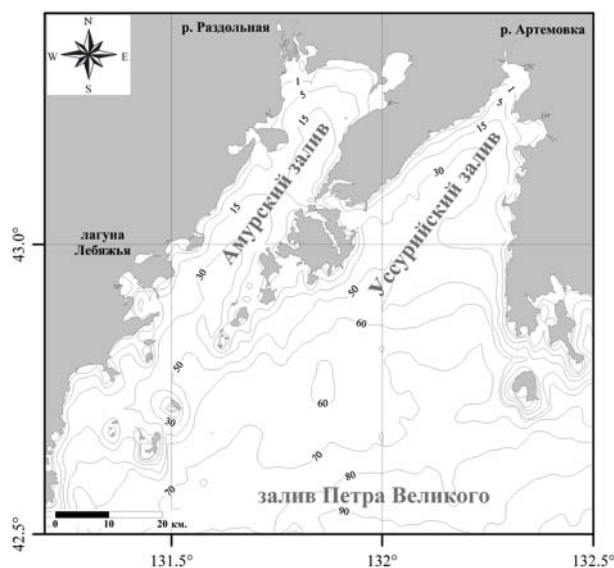


Рис. 1. Места сбора проб моллюсков (точки)

лоноватых водах эстуариев рек, приморских лагун и озер, соединяющихся с морем протоками.

Отбор моллюсков проводился в реке Раздольной (Амурский залив) и в реке Артемовке водолазным способом (рис. 1). Выловленных моллюсков доставляли в лабораторию в течении 2-х часов.

После 2-х дневной адаптации при температуре 16–18 °С проводили работы по изучению степени повреждения молекулы ДНК жаберных клеток *C. japonica*.

Жабры извлекали из моллюсков и для удаления слизи

трижды промывали холодным (4 °С) изотоническим раствором, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} (500 мМ NaCl, 12,5 мМ KCl, 5 мМ ЭДТА-Na₂ и 20 мМ Трис-HCl, pH 7,4). Затем жабры аккуратно резали ножницами на небольшие фрагменты и помещали в 4–5 мл изотонического раствора. Через 30–40 мин. инкубации выделившиеся клетки отделяли от фрагментов жабр фильтрованием через мельничный газ с диаметром ячеек 40 мкм. Клетки, находящиеся в фильтрате, осаждали центрифугированием и перерастворяли в изотоническом растворе до концентрации 10⁵ кл./мл.

В работе использовали щелочной вариант кометного анализа (Singh et al., 1988), адаптированного к морским организмам (Mitchelmore et al., 1998). 50 мкл суспензии клеток добавляли к 100 мкл 1 % легкоплавкой агарозы (ЛКВ, Швеция) в 0,04 М фосфатном буфере (pH 7,4) при 37 °С, тщательно перемешивали, наносили на предметное стекло, предварительно покрытое для лучшего прилипания 1 % раствором агарозы и накрывали покровным стеклом. Образец помещали на 3 мин в холодильник для образования геля. Покровное стекло осторожно снимали, и слайд погружали в лизирующий раствор (2,5М NaCl; 0,1М ЭДТА-Na₂, 1 % Тритон X-100; 10 % ДМСО; 0,02 М Трис, pH 10) на 1 час в темное холодное место. После промывания холодной дистиллированной водой слайды помещали в электрофорезный буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА-Na₂) и выдерживали 40 мин. Электрофорез проводили при напряжении 2 В/см в течение 15 минут. После нейтрализации (0,4 М Трис-HCl, pH 7,4) слайды окрашивали этидиум бромидом (2 мкг/мл).

Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Для обработки цифровых изображений была использована компьютерная программа CometScore Freeware v 1,5 (http://www.autocomet.com/products_cometscore.php), которая позволяет вычислять различные параметры комет, указывающих на степень повреждения клеточной ДНК. В работе мы определяли в каждой комете три параметра: 1) долю ДНК в хвосте кометы (% DNAt), 2) длину хвоста кометы (Lt).

В каждой группе моллюсков анализировали по 8 слайдов, содержащих не менее 50 комет в каждом. Статистическую оценку результатов проводили по каждому эксперименту путем сравнения среднегрупповых показателей ($P < 0.05$) поврежденности ДНК во всех группах моллюсков с использованием непараметрического критерия Даннета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены микрофотографии комет, формируемые клетками жабр *S. japonica* собранной с двух крупных рек Приморского края и в разные сезоны года (рис.2).

При визуальном анализе, видно, что молекула ДНК клеток жабр *S. japonica* собранной в устье реки Артемовка (рис. 1а) образует симметричное яркое ядро (полость в агарозе, заполненную ДНК) и окружающее его «гало», представленное вышедшими в агарозу петлями высокополимерной ДНК. В то же время, в клетках жабр моллюсков, отобранных в устье реки Раздольная, молекула ДНК образует хорошо выраженные кометы, что, очевидно, обусловлено глубокой деградацией генома и миграцией низкополимерных фрагментов ДНК (рис. 1б,с). Исходя из классификации, предложенной Коллинзом с коллегами (Collins et al., 1995), клетки

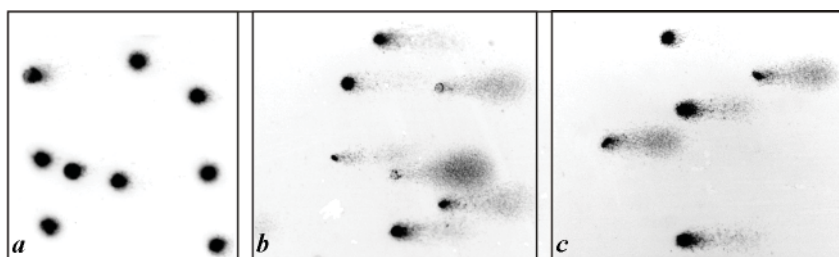


Рис.2. Микрофотографии комет, формируемые клетками жабр *S. japonica* собранных с разных районов залива Петра Великого: *a*–р. Артемовка (сентябрь); *b*–р. Раздольная (сентябрь); *c*– р. Раздольная (май)

жабр моллюсков обитающих в устье реки Артемовки образуют кометы, которые можно отнести к двум классам С0 и С1. Нередко бывает трудно визуально обнаружить разницу между кометами этих двух классов, поэтому они объединяются в одну группу (С0/С1)-комет, характерных для неповрежденных и жизнеспособных клеток (Тронов и др., 1998). Кометы, формируемые клетками жабр корбикулы, населяющей устье реки Раздольная, можно отнести преимущественно к классу С3, что свидетельствуют о высоком уровне фрагментации молекулы ДНК.

Таблица

Основные параметры ДНК-комет клеток жабр *S. japonica* собранных с разных районов с разных районов залива Петра Великого

Место сбора	Tail Length (px)	% DNA in Tail
Р. Артемовка	7,56±3,4	4,33±2,1
р. Раздольная сентябрь	91,18±39,9	40,9±12,05
р. Раздольная май	89,6 ±31,3	35,5±10,97

В таблице приведены рассчитанные параметры полученных комет (доля ДНК в хвосте кометы -% DNAt, длина хвоста кометы—Lt), отражающие степень

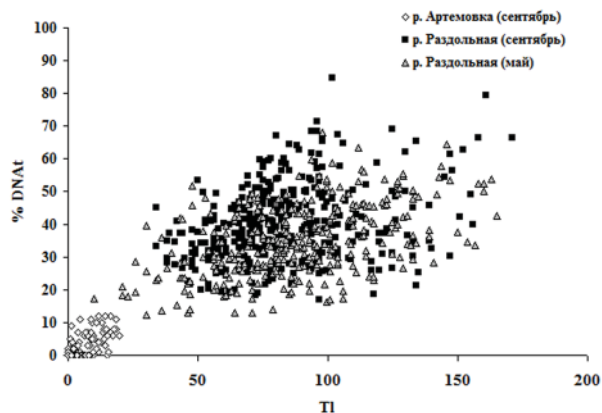


Рис. 3. Корреляция между % мигрированной ДНК (%DNAt) и длиной хвоста (Lt) комет, формируемых клетками жабр моллюсков обитающих в реках Артемовка и Раздольная.

повреждения ДНК клеток жабр моллюсков. Анализ этих данных показывает, что в клетках жабр у животных собранных в р. Раздольная значения указанных параметров существенно выше, чем у животных обитающих в р. Артемовка (таблица). Для наглядности, полученные экспериментальные данные, из которых были рассчитаны усредненные значения (таблица), были представлены на рис. 3 в виде зависимости между % ДНК и длиной «хвоста» кометы. Этот вид бивариантного распределения обычно используется для харак-

теристики популяций и наглядно демонстрирует пределы значений параметров, характеризующих кометы, и их взаимосвязь. При этом доля ДНК, мигрирующей из ядра кометы, в клетках корбикулы из реки Артемовки не превышает 10 %, тогда как в клетках моллюсков из реки Раздольной этот показатель для основной массы комет составляет 30 – 60 %. В тоже время, обращает на себя внимание высокая вариабельность данных параметров, что свидетельствует о гетерогенности всех выборок комет. Похожая картина была отмечена авторами при аккумуляции кадмия клетками жабр *C. japonica* и *Mizuhopecten yessoensis* (Слободскова, 2010; Slobodskova, 2010).

Исходя из обзора имеющихся литературных данных, можно сделать вывод, что результаты нашего исследования отражают сложившуюся обстановку, по уровню загрязнения в реке Раздольной. На сегодняшний день она является одной из самых загрязненных рек в Приморском крае. Среднее течение реки находится в зоне достаточно интенсивного сельскохозяйственного возделывания земель, а нижнее подвергается мощному антропогенному прессингу: именно здесь расположены стоки коллекторов г. Уссурийск, железнодорожных предприятий, мясокомбината, сахарного завода, картонной фабрики и кожевенного комбината (Никулина, 2006; Кику, 2008). Оказывает негативное влияние на состав вод реки Раздольной и интенсивно развивающееся хозяйство северных провинций Китая, расположенных в ее верховье (Шулькин, 2005). Такое комплексное антропогенное воздействие, несомненно, отражается на состоянии гидробионтов, что наглядно демонстрируют наши результаты (рис.2 *b,c*). На микрофотографиях отчетливо видна деградированная молекула ДНК жаберных клеток корбикулы, населяющей этот район. Полученные с помощью метода ДНК-комет экспериментальные данные свидетельствуют о том, что моллюски обитающие в эстуарии р. Раздольная находятся под влиянием мощного антропогенного прессинга. Представленные фотографии (рис.2 *b,c*) наглядно демонстрируют, где уровень повреждения ДНК, практически не изменяется в зависимости от сезонов года. В связи с чем, можно предположить, что загрязнение реки Раздольной носит хронический характер. При этом одной из основных мишеней для различных ксенобиотиков является непосредственно молекула ДНК. Так как длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды сопровождается накоплением повреждений ДНК и угнетению системы репарации, что в свою очередь может привести к мутациям и онкогенезу.

В то же время на прилегающей территории реки Артемовки в последние годы наблюдается спад производства, в связи с чем, уровень загрязнения в реке снизился (Кику, 2008; Нигматулина, 2008). И по нашим результатам, можно сделать вывод, что состояние вод этой реки несомненно улучшилось, т.к. по данным кометного анализа генотоксических эффектов не наблюдается (рис. 2*a*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенного исследования можно сделать вывод, что антропогенное загрязнение водной акватории непосредственно отражается на гидробионтах через дезорганизацию систем восстановления клеточных структур и макромолекул, в том числе и таких значимых как молекула ДНК. Подавление системы репарации ДНК, может инициировать серьезные биологические нарушения в генетическом аппарате клетки, что в свою очередь, может привести к возникновению

мутаций и злокачественной трансформации клеток. Мы считаем, что кометный анализ дает адекватную информацию об общем уровне повреждения клеточной ДНК и может успешно применяться при мониторинге водных акваторий.

ЛИТЕРАТУРА

- Кикю Д. П., Ковековдова Л. Т. 2008.** Сравнительная оценка содержания микроэлементов в двустворчатых моллюсках из Усурийского и амурского заливов // Усурийский залив: современное экологическое состояние, ресурсы и перспективы природопользования. Материалы международной научно-практической конференции. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та. С. 94–98.
- Нигматулина Л.В. 2008.** Сравнительная оценка поступления загрязняющих веществ со сточными водами на акваторию Амурского и Усурийского заливов (Японское море) // Современное состояние водных биоресурсов: материалы науч. конф., посвященной 70-летию С.М. Коновалова. Владивосток: ТИПРО-центр. С. 595–600.
- Никулина Т. В. 2006.** Оценка экологического состояния р. Раздольная по составу индикаторных видов водорослей // Вестник ДВО РАН. №6. С. 71–78.
- Слободскова В. В., Солодова Е. Е., Слинько Е. Н., Челомин В. П. 2010.** Оценка гено-токсичности кадмия в клетках жабр двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* с помощью метода ДНК–комет // Биология моря. Т. 36, № 4. С. 303–308.
- Тронов В.А., Пелевина И. И., 1996.** Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применения метода // Цитология. Т.38. № 4/5. С. 71–75.
- Тронов В.А., Терещенко Д.Г., 1998.** Конопляников М.А. Механизм радиационной гибели лимфоцитов периферической крови человека, оцениваемая методом ДНК-комет // Биофизика. Т. 43, вып. 1. С. 115–124.
- Шулькин В. М., Семькина Г. В. 2005.** Сезонная и многолетняя изменчивость содержания и выноса биогенных соединений р. Раздольной (Приморский край) // Водные ресурсы. Т. 32, № 5. С. 575–583.
- Collins A.R., Ma A.G., Duthie S.J. 1995.** The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells // Mutation Res. V. 336. P. 69–77.
- Regoli F., Frenzili G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. 2004.** Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lisosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // Aquat. Toxicol. V. 68. P. 167–178.
- Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R., Chipman J.K. 1998.** Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the “Comet” assay // Ecotoxicology and Environmental Safety. V. 41. P. 51–58.
- Mitchelmore C.L., Hyatt S 2004.** Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay // Mar. Environ. Res. V. 58. P. 707–711.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Experimental Cell Res. V. 175. P. 184–191.
- Nacci D.E., Cayula S., Jackim E. 1996.** Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay // Aquat. Toxicol. V. 35. P. 197–210.
- Shugart L.R. 2000.** DNA damage as a biomarker of exposure // Ecotoxicology. V. 9. P. 329–340.
- Slobodskova V. V., Solodova E. E., Chelomin V. P. 2010.** DNA damage (Comet assay) as biomarker of Cd exposure in marine seed scallops *Mizuhopecten yessoensis* age 1 year // Journal of Environ. Scien. And Engineer. V. 4. № 10. P. 63–69.