

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО

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

*Тихоокеанский Океанологический Институт им. В. И. Ильичева ДВО РАН, г. Владивосток,
e-mail: slobodskovav@gmail.com*

Введение

В настоящее время все больше привлекает внимание проблема возрастающего поступления токсичных веществ в окружающую среду и последствия их воздействия на биоту. Значение загрязнения морских прибрежных акваторий обусловлено негативным влиянием ксенобиотиков на гидробионтов, действие которых проявляется только после их поглощения и накопления клеточными структурами организма (Fisher, 1995). Прибрежная зона залива Петра Великого подвержена воздействию многочисленных источников бытовых и промышленных сточных вод, в которых в большом количестве содержатся поллютанты, потенциально токсичные для биоты. Печальными примерами последствий антропогенного влияния являются бухты Золотой Рог и Диомид, Амурский залив и зал. Находка, входящие в состав зал. Петра Великого. Воды этих заливов на протяжении нескольких десятков лет поступают нефтяные, промышленные, органические и другие виды загрязнений из городов Владивосток, Находка (Галышева, 2004). Поэтому на сегодняшний день экотоксикологическая оценка состояния гидробионтов является необходимой составляющей биологического мониторинга прибрежной зоны залива Петра великого. В настоящее время в биологический мониторинг все шире вовлекаются биохимические экспресс – методы, основанные на анализе биохимических изменений, происходящих в организме при воздействии неблагоприятных факторов среды. Биохимические показатели (маркеры) могут служить для оценки раннего проявления повреждающего действия негативных факторов среды и, по своей сути, являются сигналами возникновения угрозы развития патологических процессов. Более того, такие маркеры приобретают особое значение при оценке совместного влияния различных видов антропогенного

стресса и варьирующих факторов биотического и абиотического характера, а также при прогнозировании отдаленных последствий воздействия поллютантов на экосистемы.

В случае водных беспозвоночных различными исследовательскими группами на основе лабораторных экспериментов был выявлен ряд биохимических показателей, которые могут быть использованы в качестве специфических (индикаторы воздействия определенной группы токсинов) и неспецифических (индикаторы воздействия широкого спектра химических веществ) маркеров. Среди последних, в рамках рассматриваемой проблемы, наибольший интерес представляют показатели, характеризующие уровень повреждения ДНК, который выявляется в настоящее время с помощью метода ДНК-комет (Comet assay, SCGE) (Singh et al., 1988). Данный подход основан на определении степени повреждения ДНК (расплетание цепей, разрывы на различных участках ДНК) под воздействием негативных факторов. Влияние генотоксикантов на организм в первую очередь приводит к структурным модификациям в ДНК, впоследствии нарушая нормальное протекание клеточных процессов. Разрывы в цепях ДНК являются общим следствием действия генотоксичного агента, т.е. являются чувствительным конечным этапом разрушения. Методы количественного определения разрывов ДНК часто основаны на взаимосвязи между их образованием и скоростью появления цепей ДНК в щелочных условиях. 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).

Основное преимущество метода заключается в его способности регистрировать повреждения на уровне отдельной эукариотической клетки, прак-

тически любого происхождения. Для анализа образца методом ДНК-комет необходимо наличие всего нескольких тысяч клеток. Также привлекает быстрота проведения экспериментов и относительная простота лабораторного протокола.

Цель нашей работы состояла в оценке генотоксичности среды обитания на степень повреждения молекулы ДНК жаберных клеток эстуарного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* методом ДНК-комет (Comet assay, SCGE).

Материалы и методы

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

Отбор моллюсков проводился в устье реки Артемовка (Уссурийский залив), в устье реки Раздольная (Амурский залив) и в лагуне Лебяжья водолазным способом. Выловленных моллюсков доставляли в лабораторию в течении 2–х часов после отбора.

После 2–х дневной адаптации при температуре 16–18 °С проводили работы по изучению степени повреждения молекулы ДНК жаберных клеток *C. japonica*, обитающей в разных районах залива Петра Великого.

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- Na_2 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 10^5 кл./мл.

В работе использовали щелочной вариант кометного анализа (Singh et al., 1988), адаптированного к морским организмам (Mitchellmore et al., 1998). 50 мкл суспензии клеток добавляли к 100 мкл 1% легкоплавкой агарозы (LKB, 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- Na_2 , 1% Тритон X–100; 10% ДМСО; 0.02М 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- Na_2) и выдерживали 40 мин. Электрофорез проводили при напряжении 2 В/см в течение 15 минут. После нейтрализации (0.4М 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 v1.5 (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

При визуальном анализе, видно, что молекула ДНК клеток жабр *C. japonica* собранной в устье реки Артемовка и лагуне Лебяжья (Рис. 1а, 1б) 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. 1с). Исходя из классификации, предложенной Коллинзом с коллегами (Collins et al., 1995), клетки жабр моллюсков обитающих в устье реки Артемовка и лагуне Лебяжья обра-

зуют кометы, которые можно отнести к двум классам C0 и C1. Нередко бывает трудно визуально обнаружить разницу между кометами этих двух классов, поэтому они объединяются в одну группу (C0/C1)-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 C3, что свидетельствует о высоком уровне фрагментации молекулы ДНК.

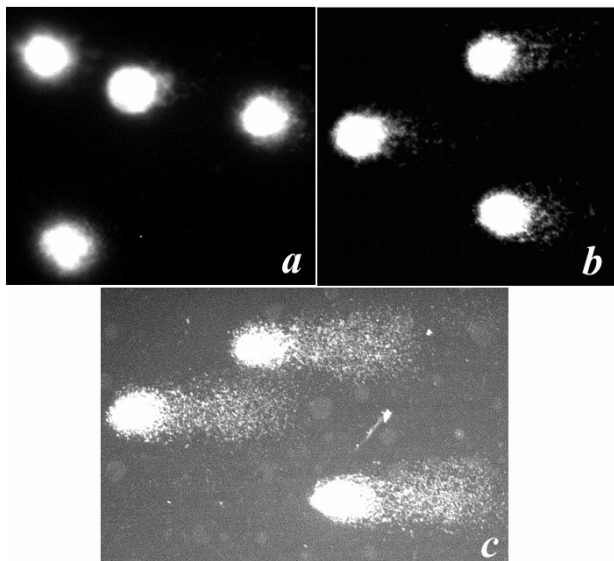


Рис. 1. Степень повреждения молекулы ДНК жаберной ткани *C. japonica* (a) эстуария реки Артемовка; (b) лагуна Лебяжья (c) эстуария реки Раздольная

В таблице приведены рассчитанные параметры полученных комет (доля ДНК в хвосте кометы -%DNAt, длина хвоста кометы – Lt), отражающие степень повреждения ДНК клеток жабр моллюска (см. таблицу). Анализ этих данных показывает, что в клетках жабр моллюсков, отобранных в устье реки Раздольная, значения указанных параметров существенно выше, чем в других группах моллюсков. В тоже время обращает на себя внимание высокая вариабельность этих параметров, что свидетельствует о высокой гетерогенности всех выборок комет.

Основные параметры ДНК-комет клеток жабр моллюсков *C. japonica*, собранных в разных районах залива Петра Великого

МЕСТА СБОРА МОЛ-ЛЮСКОВ	LT	% DNAt
р. АРТЕМОВКА	7,56±3,4	4,33±2,1
р. РАЗДОЛЬНАЯ	91,18±38,1	40,90±12,05
ЛАГУНА ЛЕБЯЖЬЯ	36,25±14,92	20,79±8,40

На диаграмме (рис. 2) приведен один из параметров полученных комет (доля ДНК в хвосте кометы -%DNAt), отражающий степень повреждения жаберной ДНК *C. japonica*, обитающей в разных районах залива Петра Великого.

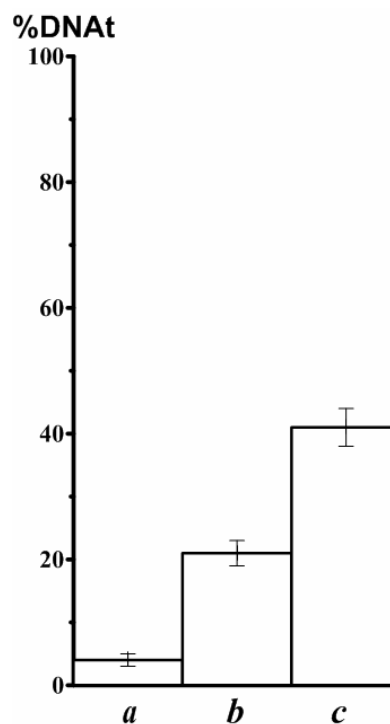


Рис. 2. Доля ДНК в хвосте комет (%DNAt) формируемых клетками жабр корбикулы, обитающей в (a) эстуария реки Артемовка ($P < 0.05$); (b) лагуна Лебяжья ($P < 0.05$); (c) эстуария реки Раздольная ($P < 0.05$)

Для наглядности, полученные экспериментальные данные, из которых были рассчитаны усредненные значения (таблица), были представлены на рисунке 3 в виде зависимости % ДНК и длиной «хвоста» кометы. Этот вид бивариантного распределения обычно используется для характеристики популяций и наглядно демонстрирует пределы значений параметров, характеризующих кометы, и их взаимосвязь. Из представленных результатов (рис. 3) особенно отчетливо видна высокая гетерогенность структуры ДНК клеток жабр моллюсков, подвергшихся неблагоприятному воздействию факторов среды (р. Раздольная). При этом доля ДНК, мигрирующей из ядра кометы, в клетках моллюсков, обитающих в устье реки Артемовка и лагуне Лебя-

жья, не превышает 10 и 12% соответственно, тогда как в клетках моллюсков, полученных из

устья реки Раздольная, этот показатель для основной массы комет составляет 40–45%.

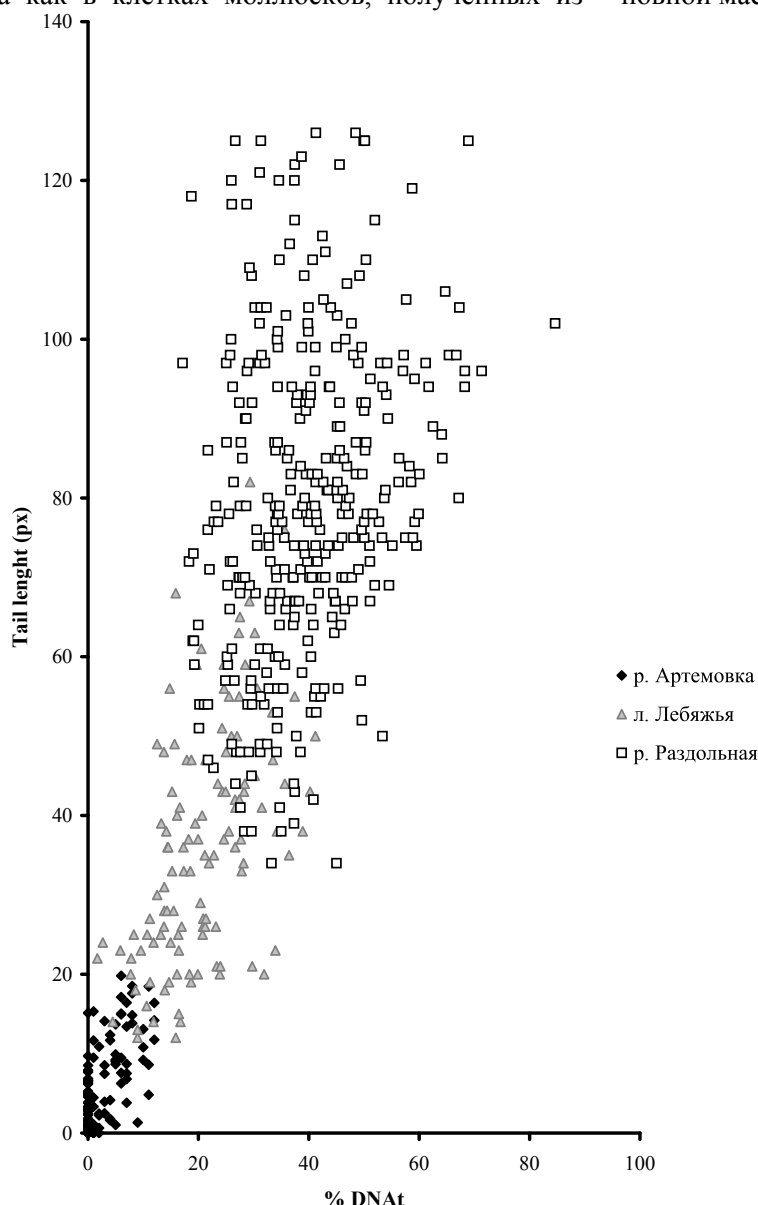


Рис. 3. Корреляция между процентом мигрированной ДНК($\%DNAt$) и длиной хвоста (Lt) комет, формируемых клетками жабр *S. japonica* собранной в размых районах залива Петра Великого

Полученные данные свидетельствуют о том, что метод ДНК-комет обладает чувствительностью для выявления повреждений молекулы ДНК, вызванных неблагоприятной средой обитания. Похожие результаты были получены и другими авторами на моллюсках (Cotelle, 1999; Wilson, 1999; Sasaki, 1997; Hamoutene, 2002; Pavlicia, 2001; Regoli et al., 2004), ракообразных (Lee, 1999; Lee, 2000), рыбах (Pandurangi, 1995; Deventer, 1996; Adb-Allah, 1999), амфибиях (Clements, 1997) полихетах (De Boeck, 1997). Это говорит о том, что метод ДНК-комет, прекрасно зарекомендовал себя в экотоксикологическом мониторинге водной среды.

Исходя из обзора имеющихся литературных данных, можно сделать вывод, что результаты нашего исследования отражают сложившуюся обстановку, по уровню загрязнения в заливе Петра Великого. Так, например река Раздольная, на сегодняшний день 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). Ока-

зывает негативное влияние на состав вод реки Раздольной и интенсивно развивающееся хозяйство северных провинций Китая, расположенных в ее верховье (Шулькин, 2005). Комплексное антропогенное воздействие отражается на состоянии гидробионтов, что наглядно демонстрируют наши результаты (рис. 1с). На микрофотографии отчетливо виден деградированный геном жаберных клеток корбикулы, населяющей этот район.

На прилегающей территории реки Артемовка 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 реки Артемовка улучшилось, т.к. по данным кометного анализа генотоксических эффектов не наблюдается (рис. 1а).

Лагуна Лебяжья, находится в отдаленном районе залива Петра Великого, где исключено сильное антропогенное воздействие на водную экосистему. Данный регион характеризуется отсутствием промышленности и считается одним из самых незагрязненных районов залива Петра Великого. Наши данные свидетельствуют о том, что при отсутствии выраженной антропогенной нагрузки на водные экосистемы, клетки жабр

корбикулы образуют слабовыраженные ДНК-кометы (рис. 1б). Повреждения такого типа характерны для неповрежденных и жизнеспособных клеток.

К сожалению, мониторинг прибрежной зоны залива Петра Великого, с использованием метода ДНК-комет только начинается. Наша работа является одной из первых, в которой мы предлагаем оценить степень генотоксичности среды обитания гидробионтов этим методом. Работы такого плана, несомненно, важны, потому что, учитывая исключительную роль генома в функционировании биологической системы, повреждения в структуре молекулы ДНК относятся к наиболее важным проявлениям токсичности среды обитания. 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 заключении можно отметить, что метод ДНК-комет обладает достаточной чувствительностью, необходимой для регистрации повреждений ДНК на уровне отдельной клетки и может быть применен для оценки генотоксичности водной среды залива Петра великого.

Литература

Галышева Ю. А. Сообщества макробентоса сублиторали залива Восток Японского моря в условиях антропогенного воздействия // Биол. моря. 2004. Т. 30, № 6. С. 423–431.

Кику Д. П., ковековдова Л. Т. Сравнительная оценка содержания микроэлементов в двустворчатых моллюсках из Уссурийского и амурского заливов // Уссурийский залив: современное экологическое состояние, ресурсы и перспективы природопользования. Материалы международной научно-практической конференции. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2009. – С. 94–98.

Нигматулина Л. В. Сравнительная оценка поступления загрязняющих веществ со сточными водами на акваторию Амурского и Уссурийского заливов (Японское море) // Современное состояние водных биоресурсов: материалы научной конференции, посвященной 70-летию С. М. Коновалова. — Владивосток: ТИНРО-центр, 2008. — С. 595–600.

Никулина Т. В. Оценка экологического состояния р. Раздольная по составу индикаторных видов водорослей // Вестник ДВО РАН. 2006. № 6. С. 71–78.

Тронов В. А., Терещенко Д. Г., Конопляников М. А. Механизм радиационной гибели лимфоцитов периферической крови человека, оцениваемая методом ДНК-комет // Биофизика. 1998. Т. 43, вып. 1. С. 115–124.

Шулькин В. М., Семькина Г. В. Сезонная и многолетняя изменчивость содержания и выноса биогенных соединений р. Раздольной (Приморский край) // Водные ресурсы. 2005. Т. 32, № 5. С. 575–583.

Adb-Allah G. A., El-Fayoumi R. I., Smith M. J., Heckmann R. A., O'Neill K. L. A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the comet assay // Mutat. Res. 1999. Vol. 446. P. 181–188.

Clements C., Ralph S., Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay // Environ. Mol. Mutagen. 1997. Vol. 29. P. 277–288.

Collins A.R., Ma A.G., Duthie S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells // Mutation Res. 1995. V. 336. P. 69–77.

Cotelle S., Ferand J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review // Environ. Mol. Mutagen. 1999. Vol. 34. P. 246–255.

De Boeck M., Kirsch-Volders M. *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an sentinel species to assess the genotoxic risk (comet assay) of RAN exposure to the environment // Environ. Mol. Mutagen. 1997. Vol. 30. P. 82–90.

Deventer K. Detection of genotoxic effects on cell of liver and gill of *B. rerio* by means of single cell gel

electrophoresis // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1996. Vol. 56. P. 911–918.

Fisher N.S., Reinfelder J.R. The trophic transfer of metals in marine systems // Metall speciation and bioavailability in aquatic systems. New York; London; John Wiley and Sons. 1995. P. 363–396.

Hamoutene D., Payne J. F., Rahimtula A., Lee K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons // Mar. Environ. Res. 2002. Vol. 54. P. 471–474.

Lee R. F., Steinert S. A., Nakayama K., Oshima Y. Use of DNA damage (Comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. sapidus*) embryos // Environ. Toxicol. And Risk Assess.: Stand. of Biomarkers for Endocrine Disrup. and Environ. Assess. 1999. Vol. 8. P. 341–349.

Lee R., Kim G. B., Maruya K. A., Steinert S. A., Oshima Y. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxins // Mar. Environ. Res. 2000. Vol. 50. P. 553–557.

Mitchellmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R., Chipman J.K. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the «Comet» assay // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. Vol. 41. P. 51–58.

Mitchellmore C.L., Hyatt S. Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 707–711.

Nacci D.E., Cayula S., Jackim E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using

the single cell gel assay // Aquat. Toxicol. 1996. Vol. 35. P. 197–210.

Pandurangi R., Petras M., Ralph S., Vizoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp // Environ. Mol. Mutagen. 1995. Vol. 26. P. 345–356.

Pavlicia M., Kobucar G. I. V., Mojas N., Erben R., Pares D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using the comet assay // Mutat. Res. 2001. Vol. 490. P. 209–214.

Regoli F., Frenzili G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // Aquat. Toxicol. 2004. Vol. 68. P. 167–178.

Sasaki U. F., Izumiyama F., Nishidate E., Ishibashi S., Tsuda N., Matsusaka N., Asano N., Saotome K., Sofumi T., Hayashi M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study // Mutat. Res. 1997. Vol. 393. P. 133–139.

Shugart L.R. DNA damage as a biomarker of exposure // Ecotoxicology. 2000. Vol. 9. P. 329–340.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Experimental Cell Res. 1988. Vol. 175. P. 184–91.

Wilson J. T., Pascoe P. L., Parry J. M., Dixon D. R. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Plecypoda) // Mutat. Res. 1999. Vol. 399. P. 87–95.

APPLICATION OF GENOTOXIC ANALYSIS FOR MONITORING OF COASTAL ZONE OF THE PETER THE GREAT BAY

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

V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, Russia,
e-mail: slobodskova@poi.dvo.ru

The coastal zones of seas and oceans, where the center of the main stocks of biological resources that may be susceptible to a variety of anthropogenic factors, which have various effects on marine organisms and affects all levels of the

organization of living systems – from the molecular to the ecosystem. In connection with, the actual problem is reliable and operational ecotoxicological assessment of the relevant sea areas.