



Биолог. журн. Армении, 4 (67), 2015

АНАЛИЗ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК У ЯЩЕРИЦ *DAREVSKIA RADDEI*, ОБИТАЮЩИХ В ЗОНАХ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ, МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

А.Э. СИМОНЯН¹, А.Л. ГЕВОРКЯН¹, С.Г. МИНАСЯН³,
А.А. САРГСЯН¹, М.С. АРАКЕЛЯН²

¹Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии,
²кафедра зоологии, ³Институт химической физики НАН РА
genetanatgc@yahoo.com

Уровень повреждений ДНК в эритроцитах скальных ящериц *Darevskia raddei* из заповедника Шикаох и Каджарана (Республика Армения) и Зуара (Нагорно-Карабахская Республика) оценивали методом ДНК-комет. Самки ящериц оказались более чувствительны к загрязнителям среды, чем самцы. Показана достоверная положительная корреляция между уровнем повреждений ДНК у самок и содержанием Cu, Mo, Pb, Cd, V и As в почве.

Метод ДНК-комет – скальные ящерицы- генотоксичность почвы

ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը գնահատվել է Շիկահողի արգելոցում, Քաջարանում (Հայաստանի Հանրապետություն) և Զուարում (Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետություն) բնակվող *Darevskia raddei* ժայռային մողեսների էրիթրոցիտներում՝ ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով: Ցույց է տրվել, որ էգ մողեսները ավելի զգայուն են շրջակա միջավայրի աղտոտիչների նկատմամբ, քան արուները: Հավաստի դրական կորելյացիա է հայտնաբերվել էգ մողեսների ԴՆԹ-ի վնասվածքների և հողում Cu, Mo, Pb, Cd, V ու As պարունակության միջև:

ԴՆԹ-կոմետ մեթոդ – ժայռային մողեսներ – հողի զենաթունայնություն

The levels of DNA damage in erythrocytes of rock lizards *Darevskia raddei* from reserve Shikahogh and Kajaran (Republic of Armenia) and Zuar (Nagorno-Karabakh Republic), were assessed using the comet assay. Female lizards were more sensitive to environmental pollutants than males. Significant positive correlation was found between DNA damage in female lizards and content of Cu, Mo, Pb, Cd, V and As in soil.

Comet assay-rock lizards-soil genotoxicity

Загрязнение почв является одним из основных путей попадания в окружающую среду различных загрязнителей. Одним из основных методов оценки генетических эффектов в экотоксикологических исследованиях является метод ДНК-комет, который позволяет оценивать повреждения и репарацию ДНК. Для оценки влияния генотоксических загрязнителей почвы в качестве биоиндикаторов применяют растения, грызунов и дождевых червей [1]. Важной задачей экогенотоксикологии является адаптация метода ДНК-комет к различным диким видам, распространенным на загрязненных территориях и проявляющих достаточно высо-

кую чувствительность к мутагенам. В частности, чувствительными биоиндикаторами загрязнения среды являются пресмыкающиеся, однако в настоящее время их применение в экотоксикологии ограничено [2]. Ящерицы чувствительны к загрязнению среды, в частности, тяжелыми металлами [3]. Показана эффективность генетического мониторинга у ящериц с применением метода ДНК-комет [4].

В Армении распространены скальные ящерицы *Darevskia raddei*, возможность использования которых в качестве биоиндикаторов загрязнения почв изучена в представленной работе. С этой целью были проанализированы уровни повреждений ДНК у ящериц *D. raddei*, обитающих в Шикаохе, Каджаране и Зуаре методом ДНК-комет.

Материал и методика. Повреждения ДНК оценивали в эритроцитах самок и самцов скальных ящериц *D. raddei* из заповедника Шикаох (9 самцов и 6 самок) и Каджарана, (6 самцов и 5 самок) Армении и Зуара, (10 самцов и 7 самок) Нагорный Карабах. Заповедник Шикаох был выбран в качестве контрольного сайта. Почва в Каджаране загрязнена выбросами медно-молибденового комбината. Почва Зуара обогащена рядом соединений в связи с высоким уровнем сейсмической активности в этом районе.

Образцы крови брались из хвостовой вены от каждой ящерицы. Гепаринизированная кровь разбавлялась PBS (phosphate-buffered saline) в соотношении 1:80. Для оценки повреждений ДНК применяли щелочную версию метода комет [5]. На предметные стекла, покрытые слоем 1%-ного раствора агарозы, капали смесь 10 мкл крови с 90 мкл легкоплавкой агарозы (LMA). Препараты помещали в лизирующий раствор (2.5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис, рН 10.0 с Тритоном X-100) на 24 ч при 4⁰С. По окончании лизиса препараты погружали в щелочной буфер (300 мМ NaOH и 1 мМ ЭДТА) на 20 мин для раскручивания цепей ДНК. Электрофорез проводили 15 мин (26 В и 300 мА). Препараты промывали нейтрализационным буфером (0.4 мкг/мл Трис, рН 7.5) и окрашивали бромистым этидием (4 мкг/мл). Оценку процента ДНК в хвосте кометы и момент хвоста кометы проводили с применением программы Comet Assay VI. Статистическую обработку данных проводили с применением Multiple range test и корреляционного анализа Пирсона по статистической программе Statgraphics Centurion 16.2.

Результаты и обсуждение. Анализ повреждений ДНК у скальных ящериц *D. raddei* с применением мультифакториального анализа (MANOVA) показал, что в загрязненном Каджаране процент ДНК в хвосте кометы у самок (21.22±2.18) достоверно выше, чем у самцов (15.85±1.98, $p < 0.001$). В Шикаохе процент ДНК в хвосте кометы у самок (14.60±1.68) и самцов (16.22±1.66) достоверно не различается. Также не обнаружены различия между процент ДНК в хвосте кометы у самок (7.61±0.72) и самцов (6.68±0.61) из относительно экологически чистой территории Зуара. Принимая во внимание различия в чувствительности к загрязнителям среды между полами у ящериц из загрязненной зоны, сравнение повреждений ДНК в изученных сайтах было проведено только на самках (табл. 1).

Таблица 1. Повреждения ДНК у самок скальных ящериц *D. raddei*, обитающих в заповеднике Шикаох, Каджаране и Зуаре

Среда обитания	Количество ящериц	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста
Шикаох	6	14.60±1.68 ^b	2.66±0.27
Каджаран	5	21.22±2.18 ^{a,b}	4.68±0.63 ^{a,b}
Зуар	7	7.61±0.72	1.12±0.09

a - достоверная разница по сравнению с контрольным сайтом (Шикаох), $p < 0.01$

b - достоверная разница по сравнению с Зуаром, $p < 0.01$

У ящериц Каджарана обнаружено достоверное повышение процента ДНК в хвосте кометы и момента хвоста как по сравнению с контрольным сайтом (Шикаох), так и с Зуаром. Также показано, что уровень поврежденных ДНК по параметру процента ДНК в хвосте кометы у ящериц Шикаоха выше, чем у ящериц Зуара. Таким образом, по показателям поврежденных ДНК у ящериц *D. raddei* территория Каджарана является наиболее загрязненной генотоксикантами. Несмотря на сейсмоактивность, уровень генотоксической загрязненности в Зуаре ниже, чем в Шикаохе.

Связь между повреждениями ДНК у ящериц *D. raddei* и загрязнением почв Co, Cr, Cu, Zn, Mo, Ag, Pb, Cd, P, V и As проанализирована с применением корреляционного анализа. Обнаружена достоверная положительная корреляция между процентом ДНК в хвосте кометы и моментом хвоста и содержанием Cu, Mo, Pb, Cd, V и As (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициент корреляции Пирсона между повреждениями ДНК (%ДНК в хвосте кометы) у ящериц *D. raddei* и уровнем загрязнителей в почве, а также содержание в почве исследованных элементов, мг/кг

Загрязнители в почве	Содержание в почве загрязнителей, мг/кг			Коэффициент корреляции Пирсона
	Шикаох	Каджаран	Зуар	
Cu	0.02	0.54	0.04	0.64*
Mo	0.0006	0.05	0.0006	0.65*
Pb	0.008	0.02	0.01	0.58*
Cd	0.00017	0.0002	0.00018	0.50*
V	0.09	0.29	0.06	0.69*
As	0.006	0.03	0.007	0.64*

* – достоверная положительная корреляция, $p < 0.05$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что анализ повреждений ДНК методом ДНК-комет у скальных ящериц *D. raddei* является чувствительным индикатором генотоксичности почвы и может успешно применяться для оценки загрязнения окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *de Lapuente J., Lourenço J., Mendo S.A., Borràs M., Martins M.G., Costa P.M., Pacheco M.* The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Front Genet*, 4, 6, 180, 2015.
2. *Hopkins, W.A.* Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2391-2393, 2000.
3. *Oyekunle J.A. O., Adekunle A.S., Ogunfowokan A.O., Akanni M.S., Coker O.S.* Agama lizard: A potential biomarker of environmental heavy metal pollution assessment. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 12, 6, 458-463, 2012.
4. *Schaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D.* Baseline values of Micro-nuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 99-103, 2012.
5. *Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-221, 2000.

Поступила 25.08.2015