

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՍՊՈՐՏԻ
ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՍԱՐԳՍՅԱՆ ԱՆԺԵԼԱ ԱՇՈՏԻ

**ՔՍԵՆՈԲԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԵՎ ԷՊԻԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ
ԷՖԵԿՏՆԵՐԸ ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՏԱՐԲԵՐ ՇՐՋԱՆՆԵՐՈՒՄ ՏԱՐԱԾՎԱԾ
ԿԵՆՍԱՑՈՒՑԻՉ ՕՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐՈՒՄ**

Գ.00.15 - «Գենետիկա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսությամբ

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2024

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

САРГСЯН АНЖЕЛА АШОТОВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
КСЕНОБИОТИКОВ У БИОИНДИКАТОРНЫХ ОРГАНИЗМОВ ИЗ
РАЗЛИЧНЫХ РАЙОНОВ АРМЕНИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.15 - «Генетика»

ЕРЕВАН – 2024

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ, պրոֆ.
Ռուբեն Միրայելի Հարությունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ., Կարինե Ռաֆիկի Մայիլյան
կ.գ.թ., Վիկտոր Եվգենիի Սպանգենբերգ

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՌԳ Հարավային դաշնային համալսարանի
Դ.Ի. Իվանովսկու անվան
կենսաբանության և կենսատեխնոլոգիայի
ակադեմիայի գենետիկայի ամբիոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2025թ. հունվարի 24-ին, ժամը 14⁰⁰-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲԿԳԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2024թ. դեկտեմբերի 19-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, կ.գ.դ., դոցենտ՝



Մարինե Աշոտի Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

член-корр. НАН РА,
д.б.н., проф. Рубен Михайлович Арутюнян

Официальные оппоненты:

д.б.н., Карине Рафиковна Маляян
к.б.н., Виктор Евгеньевич Спангенберг

Ведущая организация:

Кафедра генетики Академии биологии и
биотехнологии им. Д.И. Иванковского
Южного федерального университета, РФ

Защита диссертации состоится 24-го января 2025г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 051 по Биофизике при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 19-го декабря 2024г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051

д.б.н., доцент



Марине Ашотовна Парсаданян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Повышение концентрации загрязняющих веществ с генотоксическим и канцерогенным действием в окружающей среде обуславливает необходимость определения их потенциального риска для стабильности экосистемы и здоровья человека.

Для эффективного мониторинга за состоянием окружающей среды наряду с физико-химическим анализом загрязнителей применяют также биологические методы оценки их воздействия на живые организмы. Биомониторинг *in situ* с применением соответствующих биомаркеров и биоиндикаторных организмов позволяет получать интегральную оценку эффектов воздействия сложных смесей загрязнителей, которая может быть экстраполирована на человека. При этом рациональный выбор чувствительных биомаркеров и биоиндикаторных организмов, отражающих генотоксические эффекты загрязнителей, является одним из важнейших условий успешного биомониторинга окружающей среды (Tabrez et al., 2011).

Применение генетических биомаркеров как «сигналов раннего предупреждения» о негативных сдвигах в окружающей среде особенно эффективно, поскольку трансформация наследственного материала начинается на ранних этапах развития в организме патологических процессов, еще не диагностируемых на физиологическом уровне (Hoffmann et al., 2007). Молекулярно-генетические (повреждения ДНК, аддукты ДНК, дефекты репарации ДНК, генные мутации) и цитогенетические (хромосомные aberrации, обмены сестринских хроматид, появление микроядер) изменения являются наиболее часто используемыми биомаркерами генотоксичности окружающей среды (Kleinjans and van Schooten, 2002; DeMarini, 2013). При этом, хотя многие загрязнители среды вызывают эпигенетические перестройки, в частности метилирование ДНК, применение эпигенетических биомаркеров в генотоксикологических исследованиях все еще ограничено (Vandegehuchte and Janssen, 2014; Head, 2014; Parrott et al., 2014; Nilsen et al., 2016; Pham et al., 2023).

Для оценки повреждений ДНК и хромосом, вызванных генотоксичными агентами, широко используются, соответственно, метод ДНК-комет (de Lapuente et al., 2015; Gajski et al., 2019) и микроядерный тест (Bolognesi and Hayashi, 2011; Canedo et al., 2021). Модифицированная версия метода ДНК-комет позволяет, в частности, оценить уровень глобального метилирования ДНК (Wentzel et al., 2010; Lewies et al., 2014), хотя в генотоксикологических исследованиях ее применение весьма ограничено.

Для эффективного прогнозирования последствий воздействия загрязнителей среды на живые организмы рекомендуется использовать одновременно несколько генетических биомаркеров (Nikinmaa, 2014). С этой целью применяют различные виды обитающих на изучаемой территории растений и животных, по состоянию и поведению которых судят об изменениях в природной среде и о наличии в ней загрязнителей. При этом следует учитывать и различия между организмами в чувствительности и адаптации к загрязняющим веществам. В частности, эктотермные животные являются более чувствительными биоиндикаторами оценки загрязнения окружающей среды по сравнению с эндотермными, поскольку характерная для первых более медленная скорость метаболизма задерживает детоксикацию ксенобиотиков (Schaumburg et al., 2012; DeLong et al., 2018). Особый интерес для экологических исследований представляют генетически однородные партеногенетические животные. Отсутствие генетической изменчивости ограничивает их способность адаптироваться и эффективно реагировать на стрессоры окружающей среды (Fujita et al., 2020) и повышает вероятность накопления вредных мутаций (Abramjan et al., 2019), делая их более чувствительными и уязвимыми для загрязнителей окружающей среды.

В генотоксикологических исследованиях в качестве биоиндикаторов могут быть использованы различные водные и наземные животные, включая раков (Malev et al., 2010; Klobučar et al., 2012; Hong et al., 2020), дождевых червей (Uwizeyimana et al., 2017), улиток (Angeletti et al., 2013) и рептилий (Poletta et al., 2008; Strunjak-Perovic et al., 2010; Schwanz et al., 2011; Schaumburg et al. 2012).

В Армении исследования в данной области начались более 20 лет назад, приобретая все большее значение из-за уникального биоразнообразия и наличия серьезных экологических проблем. Первоначально биомониторинг *ex situ* проводили с применением растительной тест-системы *Tradescantia* (клон 02) для оценки генотоксичности воды (Атоянц, 1998; Pogosyan et al., 2002; Матевосян, 2006; Simonyan et al., 2016; Avalyan et al., 2017; Aghajanyan et al., 2018; 2019; Avalyan et al., 2020; Khosrovyan et al., 2022) и почвы (Aghajanyan et al., 2013) в Армении. В дальнейшем был внедрен биомониторинг *in situ* с применением в качестве биоиндикаторов различных видов водных и наземных животных (Narutyunyan et al., 2014; Stepanyan et al., 2015; Симонян, 2016).

В Армении изучение экологической ситуации с применением новых биомаркеров и биоиндикаторов имеет не только фундаментальное, но и сугубо практическое значение. Это продиктовано необходимостью регулярной генотоксикологической оценки факторов окружающей среды и разработки рекомендаций по эффективному мониторингу и контролю генетического и эпигенетического риска, вызванного ксенобиотиками.

Целью нашего исследования была оценка биоиндикаторных качеств (по генетическим и эпигенетическим показателям) у водных и наземных организмов в ряде районов Армении с различным уровнем загрязнения.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить чувствительность речных раков *Astacus leptodactylus*, улиток *Helix lucorum*, ящериц рода *Darevskia* и дождевых червей *Lumbricus terrestris* как биоиндикаторов генотоксического загрязнения окружающей среды.
2. Сравнить чувствительность различных тканей (на примере гемолимфы и гепатопанкреаса у улиток *H. lucorum*) к генотоксикантам окружающей среды.
3. Определить роль возраста и пола в реакции на генотоксиканты среды у ящериц рода *Darevskia*.
4. Сравнить чувствительность двуполых и партеногенетических ящериц рода *Darevskia* как биоиндикаторных организмов.
5. Оценить эффективность различных степеней метилирования ДНК как биомаркеров загрязнения среды.
6. Охарактеризовать связь между генетическими и эпигенетическими параметрами биоиндикаторных организмов и уровнями тяжелых металлов в воде и почве.
7. На основе полученных результатов выделить и рекомендовать к практическому использованию наиболее информативные генетические и эпигенетические маркеры у исследованных биоиндикаторных организмов.

Научная новизна

- Улитки *H. lucorum* были впервые применены для оценки генотоксичности почвы; показано, что они являются чувствительными биоиндикаторами на исследованных территориях.
- Впервые исследована сравнительная чувствительность тканей улиток *H. lucorum* к генотоксическому воздействию и выявлено, что гепатопанкреас более чувствителен к загрязняющим веществам, чем гемолимфа.
- Впервые у ящериц рода *Darevskia* была использована модифицированная версия метода ДНК-комет для оценки метилирования ДНК в качестве биомаркера загрязнения среды.

- Впервые исследованы возрастные различия генетических и эпигенетических показателей у двуполовых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* и показано снижение уровней повреждений ДНК и уровней метилирования ДНК с возрастом.
- Дождевые черви *L. terrestris* впервые применены для оценки генотоксичности почв Армении; при этом были адаптированы протоколы выделения целомицитов и метода ДНК комет, установлен спонтанный уровень повреждений ДНК и показана возможность применения данного вида в качестве биоиндикаторов.

Практическая ценность работы. Получены результаты о связи уровней повреждений ДНК у обитающих на территории Армении раков, улиток, ящериц и червей с загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами. Показано, что метилирование ДНК у ящериц является чувствительным биомаркером эффекта загрязнителей. Рекомендации по применению комплекса наиболее информативных генетических и эпигенетических маркеров у изученных биоиндикаторных организмов имеют несомненное практическое значение для мониторинга и контроля генетических эффектов загрязнения окружающей среды в Армении.

Апробация работы. Результаты, вошедшие в работу, были представлены и доложены на I Международной конференции «1st DNAQUA International Conference: Biotic Indices & Metrics - New trends in bioassessment of aquatic ecosystems: from organisms to DNA-based metrics» (Эсен, Германия, онлайн, 9-11 марта, 2021 г.), на V Международной конференции, посвященной Н.В. Тимофееву-Ресовскому и его научной школе «Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and Evolution» (Нор Амберд, Армения, 5-10 октября, 2021 г.) и на III Международной конференции «The Evolution of complexity and statistical physics» (Ереван, Армения, 1-4 июля, 2024 г.). По теме диссертации опубликовано 5 статей и 2 тезиса.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах, состоит из списка использованных сокращений, введения, обзора литературы, описания методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 23 рисунка и 33 таблицы. Автор выражает глубокую благодарность за ценные советы и помощь в проведении совместных исследований д.б.н. Г.Г. Оганесян, к.б.н. А.Э. Симонян, д.б.н. М.С. Аракелян, к.х.н. С.Г. Минасяну и коллективам кафедры генетики и цитологии биологического факультета и лаборатории общей и молекулярной генетики Института биологии ЕГУ.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, показаны ее научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает подробный анализ стратегии биомониторинга загрязнения окружающей среды генотоксикантами, описание генетических и эпигенетических биомаркеров генотоксичности окружающей среды, а также различных водных и наземных животных в качестве биоиндикаторов в генотоксикологических исследованиях. Представлены методы изучения генетических и эпигенетических эффектов загрязнения воды и почвы генотоксикантами. Обсуждены генотоксические и эпигенетические эффекты тяжелых металлов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованные участки. Исследования генотоксичности воды с применением раков в качестве биоиндикаторов проведены в трех участках бассейна озера Севан: в устье реки Масрик ($40^{\circ}13'25''$ с.ш. и $45^{\circ}38'21''$ в.д.) и вблизи сел Артаниш ($40^{\circ}27'19''$ с.ш. и $45^{\circ}25'12''$ в.д.) и Цапатах ($40^{\circ}24'34''$ с.ш. и $45^{\circ}28'22''$ в.д.) (рис. 1А). По данным химического анализа вод, устье реки Масрик было выбрано в качестве условного контрольного пункта. Генотоксичность почв исследована на 12 участках на территории Армении и Арцаха (рис. 1Б).

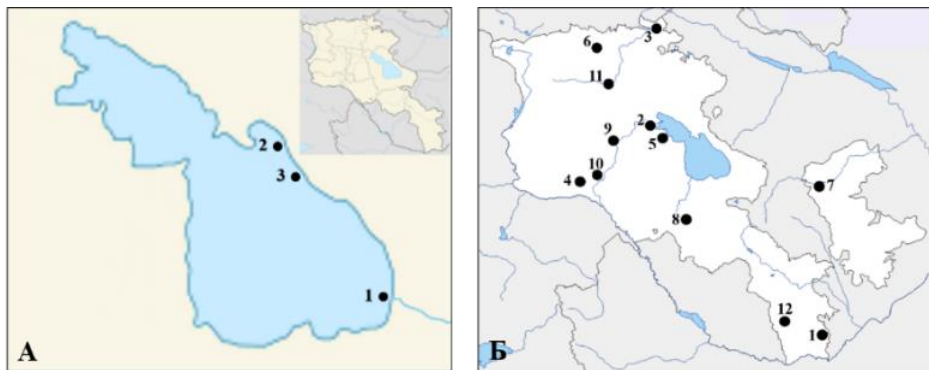


Рисунок 1. Географическое расположение участков исследования генотоксичности воды (А) в бассейне озера Севан: устье реки Масрик (1), участки вблизи сел Артаниш (2) и Цапатах (3) и почвы (Б) на территории Армении и Арцаха: заповедник «Шикаох» (1), села Лчашен (2), Кохб (3), Цахкунк (4), Лчач (5), Привольное (6), Зуар (7) и Орс (8), города Раздан (9), Ереван (10), Ванадзор (11) и Каджаран (12).

Исследования генотоксичности почвы с применением улиток в качестве биоиндикаторов проведены в заповеднике «Шикаох» ($39^{\circ}05'43''$ с.ш. и $46^{\circ}28'25''$ в.д.) и г. Каджаран ($39^{\circ}09'04''$ с.ш. и $46^{\circ}09'36''$ в.д.) Сюникской области, в селе Орс ($39^{\circ}51'45''$ с.ш. и $45^{\circ}13'49''$ в.д.) Вайоцзорской области, в г. Ереван ($40^{\circ}11'49''$ с.ш. и $44^{\circ}31'52''$ в.д.) и в селе Зуар Шаумяновского района Арцаха ($40^{\circ}04'39''$ с.ш. и $46^{\circ}13'47''$ в.д.). Заповедник «Шикаох» выбран в качестве условного контрольного участка. Исследования генотоксичности почвы с применением ящериц в качестве биоиндикаторов проводили в заповеднике «Шикаох» и г. Каджаран, в селе Привольном ($41^{\circ}08'46''$ с.ш. и $44^{\circ}26'33''$ в.д.) и г. Ванadzоре ($40^{\circ}48'46''$ с.ш. и $44^{\circ}29'18''$ в.д.) Лорийской области, в селах Лчашен ($40^{\circ}31'13''$ с.ш. и $44^{\circ}55'51''$ в.д.) и Лчач ($40^{\circ}27'40''$ с.ш. и $45^{\circ}03'54''$ в.д.) Гегаркуникской области, в селе Кохб ($41^{\circ}10'57''$ с.ш. и $44^{\circ}58'33''$ в.д.) Тавушской области, в г. Раздан ($40^{\circ}30'0''$ с.ш. и $44^{\circ}46'0''$ в.д.) Котайкской области, в г. Ереван и в селе Зуар. В качестве условно контрольных участков выбраны села Лчашен и Кохб. Оценка дождевых червей как биоиндикаторов генотоксичности почвы проведена в селе Цахкунк Армавирской области ($40^{\circ}10'50''$ с.ш. и $44^{\circ}16'15''$ в.д.) и в селе Зуар.

Химический анализ образцов воды и почвы. Химический анализ воды и почвы был проведен к.х.н. С.Г. Минасяном по стандартным методикам для воды (АРНА, 1998) и почвы (USEPA, 1996) в Центре мониторинга воздействия на окружающую среду Министерства охраны природы Республики Армения (современное название - Центр гидрометеорологии и мониторинга Министерства окружающей среды Республики Армения).

Биоиндикаторы. Для исследования генотоксичности воды в качестве биоиндикаторов применяли речных раков *Astacus leptodactylus*. Для исследования генотоксичности почвы в качестве биоиндикаторов применяли наземных улиток *Helix lucorum*, неполовозрелых (1 год) и половозрелых (старше 3 лет) ящериц из рода *Darevskia*: двуполых ящериц *D. raddei* и партогенетических ящериц *D. armeniaca* и дождевых червей *Lumbricus terrestris*. Схема исследования (таблица 1) была одобрена Национальным центром биоэтики при биологическом факультете Ереванского государственного университета.

Таблица 1. Схема проведения исследования.

Биоиндикаторы	Клетки	Биомаркеры	Методы	Раздел
Речные раки <i>Astacus leptodactylus</i>	Гемоциты	Повреждения ДНК	Метод ДНК-комет	3.1.
Улитки <i>Helix lucorum</i>	Гемоциты	Повреждения ДНК	Метод ДНК-комет	3.2.
	Клетки гепатопанкреаса			
Ящерицы рода <i>Darevskia</i>	Эритроциты	Повреждения ДНК	Метод ДНК-комет	3.3.
		Глобальное метилирование ДНК	Чувствительная к метилированию версия метода ДНК-комет	
		Микроядра	Микроядерный тест	
Дождевые черви <i>Lumbricus terrestris</i>	Целомоциты	Повреждения ДНК	Метод ДНК-комет	3.4.

Получение суспензии клеток. Образцы гемолимфы у раков брали из перикардиального синуса с антикоагулянтом (0.49 М NaCl, 30 мМ Na₂C₆H₅O₇, 10 мМ EDTA, pH 6) в соотношении 1:1.5. Гемолимфу у улиток получали из небольшого отверстия на раковине шприцем для подкожных инъекций (Angeletti et al., 2013) с гепарином, центрифугировали при 300×g/5 мин и удаляли супернатант. Мацерацию гепатопанкреаса улиток проводили в буфере PBS (pH 7.5) с добавлением 20 мМ EDTA и 10% DMSO при +4°C в течение 5 минут. После этого экстракционную жидкость центрифугировали при 300×g/10 мин и удаляли супернатант (Снегин, 2014). Образцы периферической крови у ящериц получали из хвостовой вены (Olson et al., 1977) и смешивали с гепарином в соотношении 1:10. Гепаринизированную кровь разбавляли в PBS в соотношении 1:80. Целомоциты у дождевых червей были выделены с использованием неинвазивного метода (Eyambe et al., 1991; Reinecke and Reinecke, 2004) с некоторыми модификациями. Червей помещали в экстракционный буфер (5% этанола и 95% PBS (pH 7.4) с добавлением 2.5 мг/мл EDTA) на 3 мин при комнатной температуре, под воздействием которого через поры происходила секреция целомической жидкости. Экстракционную жидкость центрифугировали при 500×g/7 мин при 4°C, супернатант удаляли, осадок промывали однократно в PBS, используя центрифугирование, в течение 10 мин при 400×g при комнатной температуре.

Щелочная версия метода ДНК-комет. Повреждения ДНК оценивали в гемоцитах речных раков *A. leptodactylus*, в клетках гемолимфы и гепатопанкреаса улиток *H. lucorum*, в эритроцитах ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca*, а также целомоцитах дождевых червей *L. terrestris* с применением щелочной версии метода ДНК-комет (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000) с небольшими модификациями для гемоцитов раков (Malev et al., 2010), гемолимфы (Janisteki et al., 2009) и гепатопанкреаса (Dailianis et al., 2005) улиток, эритроцитов ящериц (Schaumburg et al., 2012) и целомоцитов дождевых червей (Button et al., 2010).

10-20 мкл суспензии клеток с 80-100 мкл 0.5%-го раствора легкоплавкой агарозы (LMA) наносили на предметные стекла, покрытые слоем 1%-го раствора нормоплавкой агарозы и после затвердевания помещали в лизирующий раствор (2.5 М NaCl, 100 мМ Na₂EDTA, 10 мМ Tris и 1% Triton X-100, pH 10.0) на 1 ч для раков и улиток, 18 ч для

дождевых червей, 24 ч для ящериц при 4°C для разрушения протеинов и клеточных мембран. Для улотов в состав лизирующего раствора добавляли 10% DMSO. После лизиса препараты погружали в камеру для электрофореза (Cleaver Scientific, Rugby, UK), содержащий щелочной буфер (300 мМ NaOH и 1 мМ Na₂EDTA, pH>13.0) на 20 мин для раскручивания цепей ДНК. Электрофорез проводили в этом же растворе в течение 15 мин (300 мА и 1 В/см). Препараты промывали 10-15 мин буфером для нейтрализации (0.4 М Tris, pH 7.5) и окрашивали бромистым этидием (Sigma) в концентрации 20 мкг/мл. Изображения комет анализировали на флуоресцентном микроскопе ZEISS (Германия). % ДНК в хвосте кометы (Collins et al., 2008) оценивали с применением коммерческой программы Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). Для каждого животного анализировали по 150 клеток (по 50 клеток на каждом слайде).

Модифицированная версия метода ДНК-комет для оценки метилирования ДНК. Для оценки метилирования ДНК у ящериц применяли модифицированную щелочную версию метода ДНК-комет (Wentzel et al., 2010; Lewies et al., 2014). После лизиса предметные стекла погружали в реакционный буфер для рестрикционных ферментов (10 мМ Tris-HCl, 10 мМ NaCl, 1 мМ меркаптоэтанол и 2 мМ EDTA) на 10 мин. Затем на каждое предметное стекло наносили 100 мкл одной из смесей ферментов, состоящих из чувствительных к метилированию рестрикционных эндонуклеаз HpaII или MspI (1.5 ЕД/100 мкл) в 1xTango буфере (Thermo Fisher Scientific), и инкубировали в предварительно нагретой влажной камере при 37°C в течение 30 мин. Все дальнейшие процедуры проводили в соответствии со стандартной версией метода ДНК-комет. Процент метилирования CpG рассчитывали по формуле «(100–HpaII/MspI × 100) – контроль», где HpaII и MspI – средний уровень % ДНК в хвосте комет при обработке ферментами HpaII и MspI, соответственно (Lewies et al., 2014). Для каждой ящерицы анализировали по 150 клеток (по 50 клеток на каждом слайде).

Микроядерный тест. Микроядерный тест у ящериц проводили на эритроцитах периферической крови по протоколу Schaumburg et al. (2012). Тонкий мазок крови наносили на два предметных стекла для каждой ящерицы, сушили на воздухе, фиксировали в метаноле в течение 10 мин и окрашивали 10% раствором Гимза в течение 10 мин. Слайды анализировали на цифровом микроскопе Swift M10LB-P (США). Для каждой ящерицы анализировали по 2000 клеток (по 1000 клеток на каждом слайде).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ STATGRAPHICS Centurion 16.2 (StatPoint Technologies, Inc. USA; Warrenton, VA), SPSS version 19 (SPSS, Inc., an IBM Company, Chicago, IL) и GraphPad Prism Version 8.4.3 (686) (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) с применением t-теста, непараметрического теста Манна-Уитни, теста Колмогорова-Смирнова и корреляционного анализа Пирсона. Данные приводили в виде средних значений ± ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. GraphPad Prism был применен для построения гистограмм распределения клеток по уровням % ДНК в хвосте кометы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Биоиндикация загрязнения воды генотоксикантами с применением речных раков *A. leptodactylus*

3.1.1. Повреждения ДНК в гемоцитах раков *A. leptodactylus*

У раков из озера Севан, обитающих вблизи сел Артаниш и Цапатах, % ДНК в хвосте комет был достоверно выше, по сравнению с уровнем повреждений ДНК у раков из условно контрольного пункта устья реки Масрик (рис. 2).

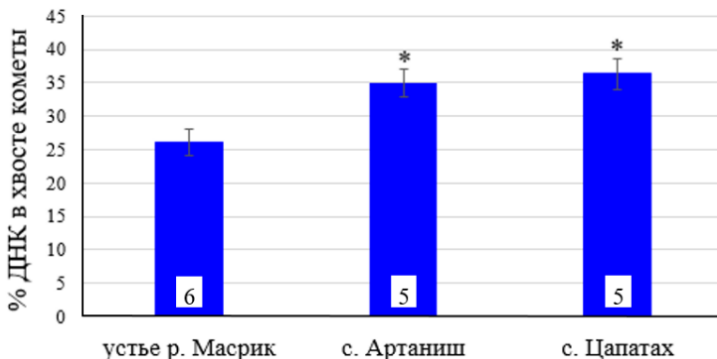


Рисунок 2. Повреждения ДНК (среднее \pm стандартная ошибка) в гемоцитах раков *A. leptodactylus*. В основании столбиков показано количество особей в варианте. * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с условно контрольной группой (тест Манна-Уитни).

3.1.2. Корреляция между повреждениями ДНК у раков *A. leptodactylus* и загрязнением воды

Выявлена достоверная положительная корреляция между параметром % ДНК в хвосте кометы у раков и содержанием Al, Fe и As в воде (таблица 2).

Таблица 2. Коэффициенты корреляции Пирсона (r) между уровнями повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus* и концентрацией загрязнителей в воде.

Параметр	Al	Cr	Fe	Ni	Cu	As	Mo
% ДНК в хвосте кометы	0.63*	-0.23	0.53*	0.12	0.33	0.75*	0.20

* $p < 0.05$ - достоверная положительная корреляция.

Согласно полученным результатам, уровень повреждений ДНК в гемоцитах раков *A. leptodactylus* соответствует уровню загрязненности вод в местах их обитания. В частности, вода вблизи сел Артаниш и Цапатах является более загрязненной по данным химического анализа и более генотоксичной по данным анализа повреждений ДНК у обитающих здесь раков по сравнению с устьем реки Масрик.

Наши результаты согласуются с Malev et al. (2010) и Klobučar et al. (2012), которые показали эффективность применения речных раков *A. leptodactylus* для оценки генотоксичности в пресноводных экосистемах с применением метода ДНК-комет и микроядерного теста. Зависимость уровней повреждений ДНК у раков от загрязнения воды металлами была показана у *A. leptodactylus* (Klobučar et al., 2012), *Penaeus monodon* (Jose et al., 2011) методом ДНК-комет и у *Procambarus clarkii* (de la Sienra et al., 2003) микроядерным тестом. Достоверная корреляция повреждений ДНК у раков с уровнями Al и Fe в воде показана только в нашем исследовании, что может быть обусловлено спецификой загрязнения исследованных водоемов и чувствительностью к загрязнителям обитающих в них раков. Обнаруженная нами корреляция уровней комет с содержанием As согласуется с данными Klobučar et al. (2012).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что оценка повреждений ДНК методом ДНК-комет в гемоцитах речных раков *A. leptodactylus* является информативным подходом для мониторинга генотоксичности воды бассейна озера Севан, а результаты работы согласуются с данными литературы об эффективности применения раков в качестве биоиндикаторов загрязнения воды.

3.2. Биоиндикация загрязнения почвы генотоксикантами с применением улиток *H. lucorum*

3.2.1. Повреждения ДНК в гемоцитах и в клетках гепатопанкреаса улиток *H. lucorum*

Повреждения ДНК в гемоцитах улиток *H. lucorum*, обитающих в Ереване и Каджаране, достоверно выше, чем в условно контрольном участке Шикаох, а у улиток из Зуара и Орс не превышают условного контрольного значения (рис. 3). Повышенный уровень повреждения ДНК в клетках гепатопанкреаса обнаружен у улиток обитающих в Орсе, Ереване и Каджаране по сравнению с условным контролем из Шикаоха (рис. 3). Наиболее высокий уровень повреждений ДНК как в гемоцитах, так и в клетках гепатопанкреаса наблюдался у улиток из Каджарана. Между повреждениями ДНК в гемоцитах и в клетках гепатопанкреаса у улиток из всех исследованных территорий обнаружен высокий уровень корреляции ($r = 0.89$, $p < 0.001$).

Распределения частоты повреждений ДНК по параметру % ДНК в хвосте в гемоцитах и в клетках гепатопанкреаса представлены на рис. 4. У улиток из Шикаоха, преобладают клетки гемолимфы и гепатопанкреаса с низким уровнем % ДНК в хвосте кометы (0-10 %). У улиток из загрязненных участков увеличивается доля более поврежденных клеток в обеих тканях и, соответственно, формы распределения меняются от асимметричных с преобладанием клеток с относительно низким уровнем повреждений ДНК к колоколообразным. Колоколообразное распределение наблюдается в гемоцитах улиток из Еревана и Каджарана и в клетках гепатопанкреаса у улиток из Орс, Еревана и Каджарана. С применением теста Колмогорова-Смирнова выявлены статистически значимые различия в распределении повреждений ДНК в гемоцитах и в клетках гепатопанкреаса у улиток, обитающих в участках с разным уровнем загрязнения, что согласуется с результатами сравнения повреждений ДНК по тесту Манна–Уитни.

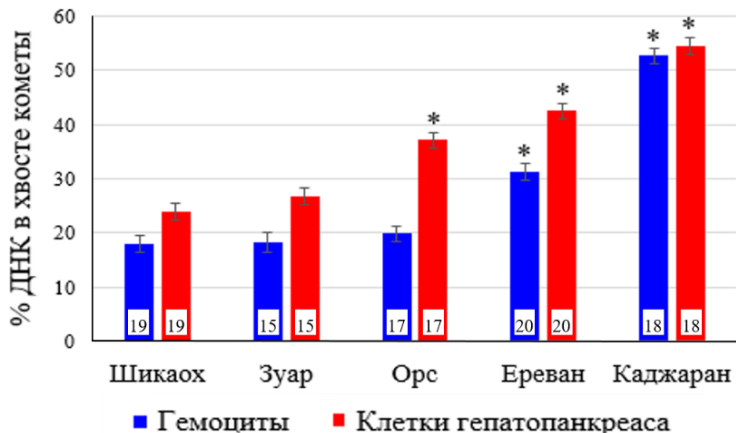


Рисунок 3. Повреждения ДНК (среднее \pm стандартная ошибка) в гемоцитах и в клетках гепатопанкреаса улиток *H. lucorum*. В основании столбиков показано количество особей в варианте. * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с условно контрольной группой (тест Манна–Уитни).

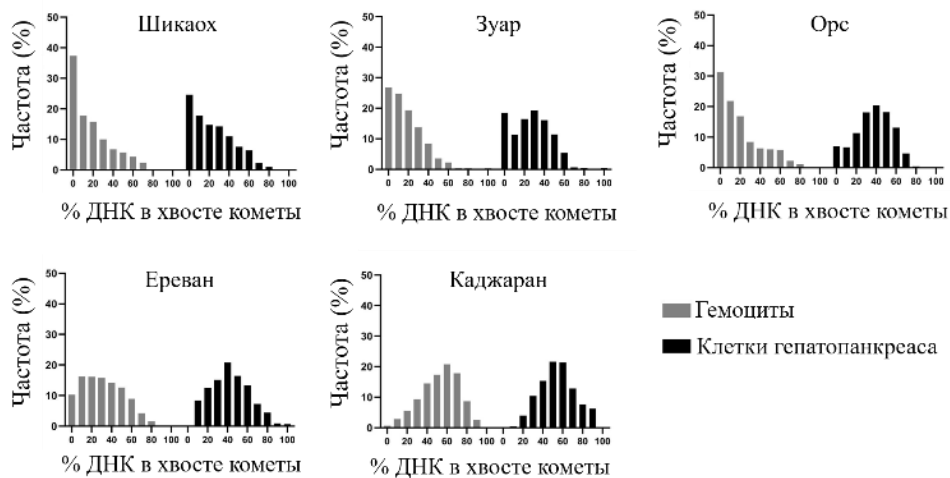


Рисунок 4. Распределение частот клеток по уровням % ДНК в хвосте в гемоцитах и в клетках гепатопанкреаса улиток *H. lucorum*.

3.2.3. Корреляция между повреждениями ДНК у улиток *H. lucorum* и загрязнением почвы

Выявлена достоверная положительная корреляция между % ДНК в хвосте кометы в клетках гемолимфы и гепатопанкреаса у улиток и содержанием Cu, As и Mo в почве (таблица 3).

Таблица 3. Коэффициенты корреляции Пирсона (r) между уровнями повреждений ДНК у улиток и концентрацией загрязнителей в почве из исследованных участков.

% ДНК в хвосте кометы	Cr	Co	Cu	Zn	As	Mo	Cd	Pb
Гемоциты	-0.25	-0.65	0.93*	-0.36	0.94*	0.93*	0.01	0.27
Клетки гепатопанкреаса	0.02	-0.57	0.79*	-0.11	0.79*	0.78*	0.26	0.49

* $p < 0.001$ - достоверная положительная корреляция.

Выявленные нами различия в уровнях повреждений ДНК у улиток *H. lucorum* позволили выделить участки с относительно высоким (Каджаран, Ереван и Орс) и относительно низким (Шикаох и Зуар) уровнем генотоксичности почв. Полученные нами результаты при работе с видом *H. lucorum* согласуются с данными литературы об эффективности применения метода ДНК-комет у улиток в качестве биоиндикаторов для мониторинга загрязнения почвы, полученными у *H. aspersa* (Angeletti et al., 2013; da Silva et al., 2013; de Souza et al., 2015), *H. (E.) vermiculata* (Angeletti et al., 2013; Itziou et al., 2011), *Cornu aspersum* (Feidantsis et al., 2020), *Bradybaena fruticum*, *Chondrula tridens*, *Cepaea vindobonensis* и *Stenomphalia ravergieri* (Snegin, 2014). Наши оценки корреляции между повреждением ДНК в гемоцитах и в клетках гепатопанкреаса у улиток *H. lucorum* и содержанием Cu, As и Mo в почве согласуются с полученными на улитках *E. vermiculata*, обработанных в лабораторных условиях металлами и органическими загрязнителями (Itziou et al., 2011).

Таким образом, в нашей работе впервые показана эффективность применения широко распространенных в Армении улиток *H. lucorum* для биомониторинга загрязнения почв генотоксикантами. Полученные результаты, в целом, согласуются с приведенными

выше выводами исследований, показывающими способность металлов, отдельно или в составе смеси загрязнителей окружающей среды, вызывать повреждение ДНК у наземных улиток.

3.3. Биоиндикация загрязнения почвы генотоксикантами с применением ящериц рода *Darevskia*

3.3.1. Повреждения ДНК в эритроцитах ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca*

Повреждения ДНК в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых двуполых ящериц *D. raddei*, обитающих в селе Лчашен, в городах Раздан и Ереван, и в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых партеногенетических ящериц *D. armeniaca*, обитающих в селе Кохб и в городе Раздан, оценивали с применением метода ДНК-комет. Отсутствие различий между уровнями повреждений ДНК у половозрелых самцов и самок *D. raddei* позволило объединить их в одну группу. Повышенный уровень повреждений ДНК был выявлен у неполовозрелых и половозрелых ящериц *D. raddei*, обитающих на загрязненных участках Раздан и Ереван, по сравнению с условно контрольным участком Лчашен. Уровень повреждений ДНК у неполовозрелых и половозрелых ящериц *D. armeniaca* из загрязненного участка Раздан, оказался достоверно выше, чем в условно контрольном участке Кохб. С возрастом уровень повреждений ДНК снижался у *D. raddei* и *D. armeniaca*. У ящериц *D. raddei* из Еревана и у ящериц *D. armeniaca* из Кохба и Раздана, эти различия достигают статистической значимости (рис. 5А,Б).

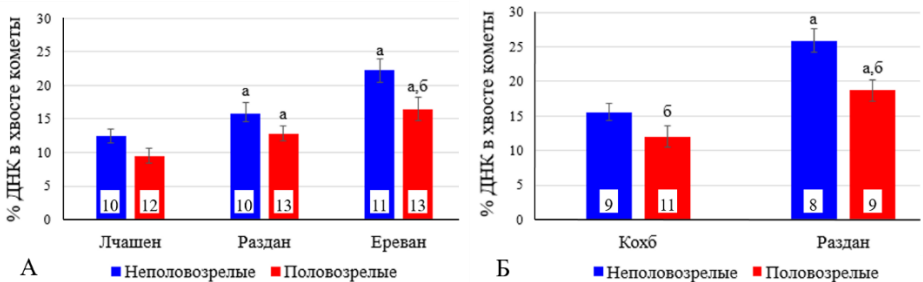


Рисунок 5. Повреждения ДНК (среднее ± стандартная ошибка) в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых двуполых ящериц *D. raddei* (А) и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* (Б). В основании столбиков показано количество особей в варианте. ^a $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с соответствующей условно контрольной группой (Лчашен или Кохб), ^b $p < 0.05$ - достоверная разница между неполовозрелыми и половозрелыми ящерицами (тест Манна–Уитни).

3.3.2. Глобальное метилирование ДНК в эритроцитах ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca*

Метилирование ДНК в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых двуполых ящериц *D. raddei*, обитающих в селе Лчашен, в городах Раздан и Ереван, и в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых партеногенетических ящериц *D. armeniaca*, обитающих в селе Кохб и в городе Раздан, оценивали с применением модифицированной версии метода ДНК-комет. Уровни метилирования ДНК, также как и уровни повреждений ДНК, не различались у половозрелых самцов и самок *D. raddei*, поэтому результаты представлены нами с объединением полов в одну группу. Уровни метилирования ДНК в эритроцитах ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca* из загрязненных участков были достоверно ниже, чем у ящериц из условно контрольных участков. С возрастом уровень метилирования ДНК снижался у обоих видов ящериц. У ящериц *D. raddei* из Раздана и у

ящериц *D. armeniaca* из Кохба и Раздана эти различия были статистически достоверны (рис. 6А,Б).

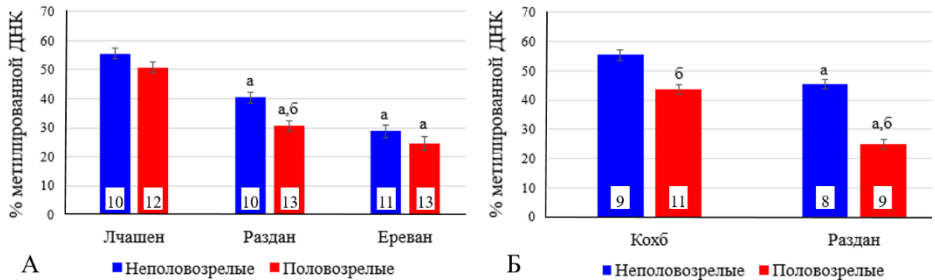


Рисунок 6. Показатели метилирования ДНК (среднее ± стандартная ошибка) в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых двуполовых ящериц *D. raddei* (А) и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* (Б). В основании столбиков показано количество особей в варианте. ^ap < 0.05 - достоверная разница по сравнению с соответствующей условно контрольной группой (Лчашен или Кохб), ^bp < 0.05 - достоверная разница между неполовозрелыми и половозрелыми ящерицами (тест Манна-Уитни).

3.3.3. Микроядра в эритроцитах ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca*

Уровни микроядер в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых двуполовых ящериц *D. raddei*, обитающих в селах Лчашен, Зуар и Лчач, в заповеднике «Шикаох» и в городах Раздан, Ереван и Каджаран (в пределах 0.11-0.36 %) и в эритроцитах неполовозрелых и половозрелых партеногенетических ящериц *D. armeniaca*, обитающих в селах Кохб, Лчач и Привольное и в городах Раздан и Ванадзор (в пределах 0.09-0.31 %) не отличались от показателей в условно контрольных пунктах (Лчашен и Кохб, соответственно).

3.3.4. Сравнительная характеристика двуполовых и партеногенетических ящериц, как биоиндикаторных организмов

Сравнение чувствительности к загрязнителям среды *D. raddei* и *D. armeniaca* в местах пересечения ареалов их обитания (Раздан и Лчач) показало, что повреждения ДНК у *D. armeniaca* достоверно выше, чем у *D. raddei* в обеих возрастных группах, а метилирование ДНК у *D. armeniaca* ниже, чем у *D. raddei* у половозрелых форм. Различия в уровнях микроядер между ящерицами *D. armeniaca* и *D. raddei* не выявлены.

3.3.5. Корреляция между повреждениями ДНК и метилированием ДНК у ящериц рода *Darevskia* и загрязнением почвы

Выявлена достоверная положительная корреляция между % ДНК в хвосте кометы у ящериц *D. raddei* и содержанием в почве Cr, Cu и Mo, а также между % ДНК в хвосте кометы у ящериц *D. armeniaca* и содержанием в почве Cr, Zn и Pb (таблица 4). Уровень метилирования ДНК у ящериц *D. raddei* отрицательно коррелирует с содержанием в почве Cr, Cu, Zn, Mo и Pb, а у ящериц *D. armeniaca* – с содержанием в почве Cr, Zn, Cd и Pb (таблица 4). Кроме того, % ДНК в хвосте кометы коррелирует с As у неполовозрелых ящериц *D. raddei*, а уровень глобального метилирования ДНК коррелирует с Mo у неполовозрелых ящериц *D. armeniaca*.

Таблица 4. Коэффициенты корреляции Пирсона (r) между уровнями повреждений и метилирования ДНК у ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca* и концентрацией загрязнителей почвы из мест их обитания.

	<i>D. raddei</i>				<i>D. armeniaca</i>			
	% ДНК в хвосте кометы		% метилированной ДНК		% ДНК в хвосте кометы		% метилированной ДНК	
	НП	П	НП	П	НП	П	НП	П
Cr	0.89**	0.95***	-0.98***	-0.95***	0.97**	0.90*	-0.88*	-0.97**
Co	0.29	0.37	-0.55	-0.64	0.30	0.22	0.05	-0.15
Cu	0.88**	0.93***	-0.98***	-0.97***	-0.74	-0.51	0.71	0.69
Zn	0.47	0.59	-0.72*	-0.85**	0.93**	0.95**	-0.94**	-0.99***
As	0.76*	0.44	-0.49	-0.41	0.23	0.66	-0.46	-0.46
Mo	0.97***	0.95***	-0.93***	-0.85**	0.67	0.58	-0.83*	-0.75
Cd	-0.12	-0.16	0.003	-0.16	0.76	0.74	-0.92*	-0.83*
Pb	0.49	0.62	-0.75*	-0.88**	0.96**	0.92**	-0.94**	-0.99***

НП- неполовозрелые, П-половозрелые. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ - достоверная положительная или отрицательная корреляция.

Согласно полученным результатам, уровни генетических и эпигенетических показателей различаются у ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca*, обитающих в участках с разным уровнем загрязнения. Более высокие уровни повреждений ДНК и более низкие уровни метилирования были обнаружены у ящериц из более загрязненных территорий по сравнению с условно контрольными участками. Из трех биомаркеров генотоксичности эффективными для оценки загрязнителей среды оказались повреждения ДНК и метилирование ДНК. Уровни микроядер у ящериц из мест обитания с разным уровнем загрязнения не отличались.

Полученные нами результаты об отсутствии различий в уровнях повреждений ДНК и микроядер между полами у ящериц *D. raddei* согласуются с данными Schaumburg et al. (2012; 2014) для ящериц *Tupinambis merianae*. Отсутствие различий в глобальном метилировании ДНК между самцами и самками ящериц рода *Darevskia* согласуется с данными Paredes et al. (2016) для ящерицы *Podarcis muralis*. Очевидно, отсутствие различий между самками и самцами можно объяснить сходством их образа жизни.

Логичное объяснение выявленного нами снижения уровня повреждений ДНК с возрастом у ящериц рода *Darevskia* можно найти в работе Schaumburg et al. (2014), где более высокие значения повреждений ДНК у новорожденных и неполовозрелых ящериц *T. merianae* объясняется незрелостью механизмов репарации. Возрастное снижение глобального метилирования ДНК в крови обнаружено у аллигаторов *Alligator mississippiensis* (Parrott et al., 2014; Nilsen et al., 2016). В то же время, низкий уровень микроядер у ящериц *Darevskia* может быть обусловлен эффективной репарацией первичных повреждений ДНК (Alhmod et al., 2020), обнаруженных с помощью метода ДНК-комет или элиминацией эритроцитов с микроядрами в селезенке (Zúñiga-González et al., 2001; Zamora-Perez et al., 2021). Таким образом, метод ДНК-комет можно считать более чувствительным, чем микроядерный тест к возрастным изменениям у ящериц *Darevskia*, что следует учитывать при биомониторинге.

Наши данные согласуются с исследованиями по оценке генотоксичности загрязнителей в природных условиях с применением рептилий в качестве биоиндикаторов, в том числе игуан *Iguana iguana* (Cabarcas-Montalvo et al., 2012), черепах *Trachemys callirostris* (Zapata et al., 2016), морских черепах *Caretta caretta* (Casini et al., 2018) и гекконов *Phylllopezus periosus* (Silva et al., 2021).

Уровень метилирования ДНК в эритроцитах *D. raddei* и *D. armeniaca* был впервые определен в нашей работе. Кроме того, впервые для оценки реакции на загрязнение окружающей среды в естественных популяциях ящериц был использован чувствительный

к метилированию метод ДНК-комет, ранее применявшийся только на дафниях (Kusari et al., 2017) и мохообразных (Ghosh et al., 2019). Полученные нами результаты о более низком уровне глобального метилирования ДНК у ящериц *Darevskia* из загрязненных участков согласуются с единственной публикацией по рептилиям о снижении глобального метилирования ДНК в эритроцитах у аллигаторов *A. Mississippiensis*, связанном с высоким содержанием Hg в местах их обитания (Nilsen et al., 2016).

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что как повреждения ДНК, так и глобальное метилирование ДНК у ящериц рода *Darevskia* являются чувствительными биомаркерами для мониторинга генотоксичности загрязнителей почвы.

Полученные нами результаты показывают более высокий уровень повреждений ДНК и более низкий уровень метилирования ДНК у партеногенетических ящериц *D. armeniaca* по сравнению с двуполовыми ящерицами *D. raddei* в местах пересечения их местообитаний. Это свидетельствует о более высокой чувствительности партеногенетических ящериц *D. armeniaca* к загрязнителям. Более того, генетическая однородность популяций партеногенетических ящериц *D. armeniaca* (Petrosian et al., 2003), позволяет оценивать влияние загрязнителей окружающей среды без возможного вклада межиндивидуальных генетических различий.

Нами было показано, что Cr, Cu, As и Mo у *D. raddei* и Cr, Zn и Pb у *D. armeniaca* могут быть ответственны за генотоксические эффекты. А также, Cr, Cu, Zn, Mo и Pb у *D. raddei* и Cr, Zn, Mo, Cd и Pb у *D. armeniaca* могут влиять на глобальное метилирование ДНК. Полученные результаты согласуются с данными о генотоксичности окружающей среды, загрязненной тяжелыми металлами, полученными с применением рептилий, обитающих на участках с комплексным загрязнением, включающим металлы (Cabarcas-Montalvo et al., 2012; Zapata et al., 2016; Casini et al., 2018; Silva et al., 2021). Различия уровней метилирования ДНК у ящериц рода *Darevskia* можно объяснить способностью некоторых тяжелых металлов вызывать гипометилирование ДНК путем ингибирования активности ДНК-метилтрансферазы (Takiguchi et al., 2003; Ryu et al., 2015; Sanchez et al., 2017).

Таким образом, наше исследование выявило корреляцию изученных генетических и эпигенетических биомаркеров у ящериц рода *Darevskia* с уровнями загрязнения окружающей среды. При этом, корреляции для некоторых металлов различаются как между видами, так и между возрастными группами ящериц. Особенную ценность для биомониторинга природной среды представляют такие свойства ящериц, как экотермность, относительно высокая продолжительность жизни и широкое географическое распространение (Freitas et al., 2016), в том числе в Армении.

3.4. Биоиндикация загрязнения почвы генотоксикантами с применением дождевых червей *L. terrestris*

Целью нашего исследования было получение референсных данных об уровнях повреждения ДНК в целомочитах дождевых червей *L. terrestris*, обитающих в районах сел Цахкунк и Зуар, с применением метода ДНК-комет. На первом этапе исследования были отработаны методики выделения целомочитов и метода ДНК-комет для *L. terrestris*. Уровни повреждений ДНК, а также распределения клеток по уровням повреждения ДНК в целомочитах дождевых червей из исследованных участков не различаются между собой (рис. 7А,Б). В обеих группах животных преобладают клетки с низким уровнем % ДНК в хвосте кометы (0-10 %) (рис. 7Б).

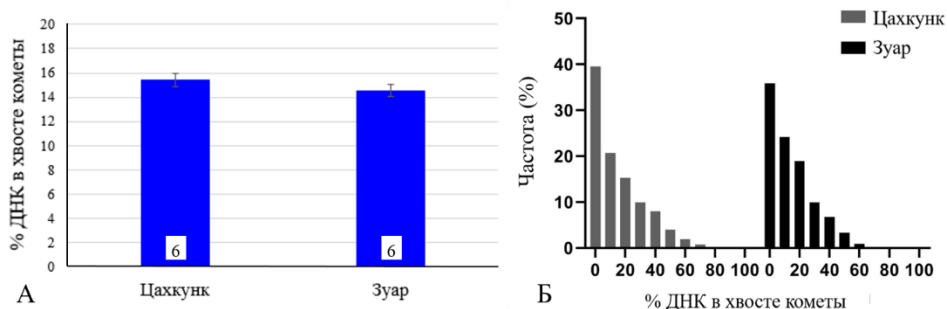


Рисунок 7. Повреждения ДНК (среднее \pm стандартная ошибка) (А) и распределение частот клеток по уровням % ДНК в хвосте (Б) в целомощитах дождевых червей *L. terrestris*. В основании столбиков показано количество особей в варианте. Различий между повреждениями ДНК ($p > 0.05$, тест Манна–Уитни) и распределениями повреждений по клеткам ($p > 0.05$, тест Колмогорова–Смирнова) между червями, обитающими на исследованных территориях, не выявлено.

Ранее было показано, что повреждения ДНК у улиток *H. lucorum* и ящериц *D. raddei* (Simoyan et al., 2018) из Зуара не превышают показатели, полученные в условно контрольном пункте Шикаох, что позволяет рассматривать территорию Зуара, как относительно незагрязненную. Уровни повреждений ДНК у червей *L. terrestris*, обитающих в селах Цахкунк (15.41 ± 0.55 % ДНК в хвосте) и Зуар (14.53 ± 0.48 % ДНК в хвосте), оказались сопоставимы с результатами исследований червей, собранных на экологически чистых территориях (Zheng et al., 2013; Канева и соавт., 2015), а также выращенных на стандартных лабораторных образцах почв (Di Marzio et al., 2005; Fourie et al., 2007; Bonnard et al., 2009; Mincarelli et al., 2016; Ramadass et al., 2016). Чувствительность изученного нами вида *L. terrestris* как биоиндикатора загрязнения почв была также подтверждена Verschaeve and Gilles (1995) и Button et al. (2010).

Полученные результаты позволяют рекомендовать продолжение исследований популяций дождевых червей *L. terrestris* с применением метода ДНК-комет для оценки загрязнения почв генотоксикантами с учетом их способности адаптироваться к загрязнителям среды (Button et al., 2010; Канева и соавт., 2015).

3.5. Сравнение чувствительности разных тканей и разных биоиндикаторов к загрязнителям

При сравнении повреждений ДНК в разных тканях было показано, что у улиток *H. lucorum* из Орас уровни повреждений ДНК достигают достоверной разницы по сравнению с условным контролем в гепатоцитах, но не выше контроля в гемоцитах (рис. 3). Различия между чувствительностью тканей к загрязнителям также очевидны на распределениях повреждений по клеткам (рис. 4). Таким образом, клетки гепатопанкреаса более чувствительны к загрязнению среды, чем клетки гемолимфы. Тканеспецифические различия в ответ на генотоксическое воздействие загрязнителей у улиток *H. lucorum* могут быть связаны с особенностями аккумуляции загрязняющих веществ или разной эффективностью репарации ДНК в гемолимфе и в гепатопанкреасе (Sabatella et al., 2021).

Сравнение результатов, полученных у улиток *H. lucorum*, ящериц *D. raddei* и *D. armeniaca* демонстрируют различия по чувствительности к металлам, содержащимся на территориях их обитания. Повреждения ДНК, определяемые методом ДНК-комет, коррелируют с концентрациями Cu, As и Mo у *H. lucorum*, Cr, Cu и Mo у *D. raddei* и Cr, Zn и Pb у *D. armeniaca*. Таким образом, повреждения ДНК у улиток и ящериц коррелируют с

разными металлами, поэтому совместное использование этих биоиндикаторов позволит выявить более широкий спектр генотоксичных загрязнителей. Различия в чувствительности к загрязнителям как между видами, так и между тканями отдельных видов организмов показаны у пресноводных рыб *Prochilodus lineatus* (Monteiro et al., 2011) и *Carassius gibelio* и *Danio rerio* (Kaloyianni et al., 2020), речных моллюсков *Anodonta woodiana*, *Cristaria plicata*, *Unio douglasiae* (Зарыхта и соавт., 2020) и морских двустворчатых моллюсков (Zhan et al., 2023) и могут быть обусловлены спецификой токсикодинамики, токсикокинетики и детоксикации, а также разными уровнями адаптивных ответов.

В целом, исследование межвидовых и межтканевых различий в чувствительности к токсикантам позволяет не только лучше понять механизмы реагирования изученных организмов на загрязнители, но и разработать рекомендации по выбору оптимальных биоиндикаторов и биомаркеров загрязнения окружающей среды.

ВЫВОДЫ

Оценка генотоксических эффектов загрязнителей воды и почвы у водных и наземных организмов в качестве биоиндикаторов с применением генетических и эпигенетических биомаркеров позволяет сделать следующие выводы:

1. Уровни повреждений ДНК в гемоцитах речных раков *A. leptodactylus*, клетках гемолимфы и гепатопанкреаса улиток *H. lucorum* и эритроцитах ящериц рода *Darevskia* соответствуют степени загрязненности воды и почв в местах их обитания. Большую чувствительность гепатопанкреаса – в сравнении с гемолимфой – у улиток *H. lucorum* к действию генотоксикантов можно объяснить функцией детоксикации чужеродных соединений в тканях гепатопанкреаса.
2. Уровни повреждений ДНК в целомоцитах дождевых червей *L. terrestris* из относительно экологически чистых мест обитания сопоставимы с результатами, полученными у других видов червей (по данным литературы), и могут служить фоновыми показателями при биоиндикации почв в Армении.
3. У ящериц рода *Darevskia* чувствительность к загрязнителям среды не зависит от пола. С увеличением возраста ящериц наблюдается снижение уровня повреждений ДНК из-за возможной адаптации к среде, а также метилирования ДНК, что может быть связано с механизмами старения. Генетически гомогенные партеногенетические ящерицы *D. armeniaca* демонстрируют более высокую чувствительность к локальным загрязнителям почвы, чем двуполые ящерицы *D. raddei*, согласно полученным нами показателям повреждения и метилирования ДНК. Микроядерный тест у ящериц оказался неэффективным биомаркером генотоксичности загрязнителей почвы.
4. Как генетические, так и эпигенетические параметры у биоиндикаторных организмов коррелируют с содержанием в почве тяжелых металлов. Степень метилирования, наряду с повреждениями ДНК у ящериц, является эффективным биомаркером загрязнителей среды, проявляя тенденцию к понижению в более загрязненных участках. Эпигенетические маркеры коррелируют с более широким кругом металлов, чем повреждения ДНК, что можно объяснить их большей чувствительностью к воздействию среды при регуляции функционирования генома.

5. Совместное применение нескольких биоиндикаторов и биомаркеров с одновременным учетом возраста биоиндикаторных организмов и типа ткани, в которой регистрируются повреждения или метилирование ДНК, необходимо для эффективного выявления широкого спектра генотоксичных загрязнителей почвы.
6. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование раков *A. leptodactylus*, улиток *H. lucorum* и ящериц рода *Darevskia* в качестве информативных биоиндикаторов для оценки загрязнения окружающей среды генотоксикантами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Sargsyan A.**, Hovhannisyan G., Simonyan A., Arakelyan M., Arzumanyan M., Aroutiounian R. Application of land snail *Helix lucorum* for evaluation of genotoxicity of soil pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2022; 878:503500. doi: 10.1016/j.mrgentox.2022.503500
2. **Sargsyan A.**, Hovhannisyan G., Simonyan A., Arakelyan M., Minasyan S., Aroutiounian R. Application of bioindicators for assessment of heavy metals' genetic and epigenetic effects in different regions of Armenia. Fifth International Conference, Dedicated to N. W. Timofeeff-Ressovsky and His Scientific School "Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and Evolution", Nor Amberd, October 5-10. 2021; 26.
3. **Sargsyan A.**, Simonyan A., Hovhannisyan G., Gabrielyan B., Aroutiounian R. Assessment of aquatic genotoxicity of the Lake Sevan basin, Armenia using natural bioindicators. 1st DNAQUA International Conference, Essen (online), March 9-11, 2021; 4:e64826. doi: 10.3897/aca.4.e64826
4. **Саргсян А.** Оценка повреждений ДНК с применением метода ДНК-комет в двух природных популяциях дождевых червей *Lumbricus terrestris*. Доклады НАН РА. 2020; 120(3):206-213.
5. **Sargsyan A.**, Simonyan A., Hovhannisyan G., Arakelyan M., Aroutiounian R. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskia* lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019; 842:117-124. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.10.005
6. Simonyan A., **Sargsyan A.**, Hovhannisyan G., Badalyan N., Minasyan S. Application of Crayfish *Astacus Leptodactylus* for the Analysis of Water Genotoxicity in the Lake Sevan Basin. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 2018; 40(6):367–369. doi:10.3103/s1063455x18060097
7. Simonyan A., Hovhannisyan G., **Sargsyan A.**, Arakelyan M., Minasyan S., Aroutiounian R. DNA damage and micronuclei in parthenogenetic and bisexual *Darevskia* rock lizards from the areas with different levels of soil pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018; 154:13-18. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.025

ՍԱՐԳՍՅԱՆ ԱՆԺԵԼ ԱՇՈՏԻ

ՔՍԵՆՈՔԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԵՎ ԷՊԻԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԼԵՖԵԿՏՆԵՐԸ ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՏԱՐԲԵՐ ՇՐՋԱՆՆԵՐՈՒՄ ՏԱՐԱԾՎԱԾ ԿԵՆՍԱՎԱԾՆԻՉ ՕՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐՈՒՄ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր` շրջակա միջավայրի աղտոտվածության գենաթունայնություն, կենսամոնիտորինգ, գենետիկական և էպիգենետիկական կենսամարկերներ, ԴՆԹ-ի վնասվածքներ, ԴՆԹ-ի մեթիլացում, միկրոկորիզներ, կենսացուցիչ օրգանիզմներ, *Astacus leptodactylus* խեցգետին, *Helix lucorum* խխունջ, *Darevskia* մողեսներ, *Lumbricus terrestris* անձրևորդ

Շրջակա միջավայրի աղտոտիչների կենսամոնիտորինգը` ներառյալ գենաթունային էֆեկտների գնահատումը, ունի կարևոր նշանակություն էկոլոգիական անվտանգության համակարգում: Օպտիմալ կենսացուցիչ օրգանիզմների և արդյունավետ կենսամարկերների ընտրությունը կարևոր հիմք է կենսամոնիտորինգի համար: Առենախոսական աշխատանքը նվիրված է մի շարք ջրային և ցամաքային կենսացուցիչ օրգանիզմներում գենետիկական (ԴՆԹ-ի և քրոմոսոմների վնասվածքներ) և էպիգենետիկական (ԴՆԹ-ի մեթիլացում) կենսամարկերների արդյունավետության ուսումնասիրությանը` ջրի և հողի գենաթույններով աղտոտվածության գնահատման համար:

Որպես կենսացուցիչներ ուսումնասիրվել են Հայաստանում լայն տարածում ունեցող *A. leptodactylus* խեցգետինների, *H. lucorum* խխունջների, *Darevskia* ցեղի մողեսների և *L. terrestris* անձրևորդերի տեսակները: Գենետիկական կենսամարկերների ընտրությունը պայմանավորված է դրանց` որպես գենաթույնների անբարենպաստ հետևանքների վաղ ազդանշաններ հանդիսանալու ունակությամբ, որոնք նախորդում են օրգանիզմում կենսական գործընթացների փոփոխություններին:

Սևանա լճի ուսումնասիրության ժամանակ Արտանիշ և Ծափաթաղ գյուղերի հարակից տարածքներից նմուշառված խեցգետինների մոտ` համեմատած պայմանական ստուգիչ Մասրիկ գետի գետաբերանի կենդանիների, դիտվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակի բարձրացում և բացահայտվել է կորելյացիա ԴՆԹ-ի վնասվածքների և ջրում պարունակվող Al, Fe և As-ի միջև:

ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը Չուար և Հորս գյուղերում, Երևան և Քաջարան քաղաքներում տարածված խխունջների մոտ բարձր է ի համեմատ պայմանական ստուգիչ Ծիկահող դիտակետից նմուշառված կենդանիների և կորելյացվում է հողում պարունակվող Cu, As և Mo-ի հետ: Ընդ որում, խխունջների հեպատոպանկրեասի բջիջներն առավել զգայուն են աղտոտիչների նկատմամբ, քան հեմոլիմֆի բջիջները:

ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակները Հրազդան և երևան քաղաքներից նմուշառված *D. raddei* երկսեռ մողեսների և Հրազդան քաղաքից նմուշառված *D. armeniaca* կուսածին մողեսների մոտ գերազանցում են պայմանական ստուգիչ Լճաշեն և Կողբ դիտակետերի մողեսներից ստացված զուգանիշներին և համապատասխանում կենդանիների բնակության միջավայրի աղտոտվածության մակարդակներին: *D. raddei* մողեսների ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը կորելյացվում է հողում պարունակվող Cr, Cu և Mo-ի, իսկ *D. armeniaca* մողեսների մոտ` հողում պարունակվող Cr, Zn և Pb-ի հետ: ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակները նվազում են աղտոտվածության մակարդակի ավելացմանը զուգընթաց և կորելյացվում *D. raddei* մողեսների մոտ հողում Cr, Cu, Zn, Mo և Pb-ի, իսկ *D. armeniaca* մողեսների դեպքում` Cr, Zn, Cd և Pb-ի հետ: ԴՆԹ-ի վնասվածքները կորելյացվում են նաև *D. raddei* ոչ սեռահատուն մողեսների խմբում հողում

պարունակվող As-ի, իսկ ԴՆԹ-ի մեթոլիացման մակարդակը՝ *D. armeniaca* ոչ սեռահատուն մոդեսների մոտ հոդում Mo-ի պարունակության հետ: *Darevskia* գեղի մոդեսների միկրոկոորիզների մակարդակները չեն գերազանցում պայմանական ստուգիչ արժեքները, ինչը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ միկրոկոորիզային թեստը մոդեսների մոտ բավարար զգայուն չէ հողի գենաթունայնության գնահատման համար: Մոդեսների ԴՆԹ-ի վնասվածքների և մեթոլիացման մակարդակները կախված չեն կենդանիների սեռից, սակայն նվազում են տարիքին զուգընթաց: Ստացված արդյունքը համապատասխանում է գրականության տվյալներին, համաձայն որի ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակի իջեցումը հանդիսանում է աղտոտիչների նկատմամբ կայունության բարձրացման ցուցիչ, իսկ ԴՆԹ-ի մեթոլիացման մակարդակի նվազումը բնորոշ է օրգանզիզմների մեծամասնության ծերացմանը: Ի համեմատ երկսեռ մոդեսների, կուսածին մոդեսներն առավել զգայուն են միջավայրի գենաթունայնության նկատմամբ՝ իրենց բնականության արեալների հատման տարածքներում:

Ծաղկունք և Չուար գյուղերում տարածված անձրևորդերի ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակները համարելի են էկոլոգիապես մաքուր վայրերից նմուշառված կամ լաբորատորիայում ստանդարտ հողում աճեցված տարբեր տեսակի անձրևորդերի ցուցանիշներին (ըստ գրականության տվյալների):

Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ բոլոր ուսումնասիրված օրգանզիզմները զգայուն կենսացուցիչներ են ջրի և հողի գենաթունայնության կենսամոնիտորինգի համար: Շրջակա միջավայրի աղտոտիչների գենաթունայնության գնահատման համար առավել տեղեկատվական կենսամարկերներ են հանդիսանում ԴՆԹ-ի վնասվածքների ու մեթոլիացման ցուցանիշները՝ ԴՆԹ-կոմեռ մեթոդի հիմնային և մեթոլիացման նկատմամբ զգայուն տարբերակների գնահատմամբ:

Արդյունավետ կենսամոնիտորինգի համար անհրաժեշտ է նաև հաշվի առնել գենաթունայնության նկատմամբ հյուսվածքների զգայունությունների հնարավոր տարբերությունները և տարիքից կախված գենետիկական ու էպիգենետիկական էֆեկտների դրսևորումները: Ստացված արդյունքներն արտացոլում են ջրի և հողի աղտոտիչների խառնուրդի գումարային գենաթունային էֆեկտը: Կորեյացիոն վերլուծությունը թույլ տվեց բացահայտել գենետիկական և էպիգենետիկական էֆեկտների ձևավորման մեջ առավել մեծ ներդրում ունեցող մի շարք ծանր մետաղներ:

ԴՆԹ-ի վնասվածքները խիսունջների և մեղեսների մոտ կորելացվում են հողում տարբեր մետաղների հետ, հետևաբար նախընտրելի է համատեղ կիրառել տարբեր կենսացուցիչներ՝ գենաթունային աղտոտիչների առավել ընդարձակ շրջանակ բացահայտելու համար: Մոնիտորինգի համար կուսածին մոդեսների ընտրությունը գերադասելի է՝ շրջակա միջավայրի աղտոտիչների նկատմամբ դրանց առավել բարձր զգայունությամբ և երկսեռ մոդեսների համեմատ առավել սահմանափակ միջանհատական տարբերություններով պայմանավորված: Մոդեսների գենետիկական և էպիգենետիկական էֆեկտների ցուցանիշները նույնպես կորելացվում են աղտոտիչների կոնցենտրացիաների հետ, ինչը կարևորում է տարբեր կենսամարկերների համակցման անհրաժեշտությունը:

Այսպիսով, ստացված արդյունքները թույլ են տալիս երաշխավորել Հայաստանում լայն տարածված խեցգետինների, խիսունջների, մոդեսների՝ հատկապես կուսածին տեսակների, և անձրևորդերի կիրառումը՝ որպես կենսացուցիչներ, իսկ որպես կենսամարկերներ ԴՆԹ-ի վնասվածքների և մեթոլիացման գնահատումը, կենդանիների բնականության միջավայրի գենաթունային աղտոտիչների մոնիտորինգի համար:

THE GENETIC AND EPIGENETIC EFFECTS OF XENOBIOTICS IN
BIOINDICATOR ORGANISMS FROM DIFFERENT REGIONS OF ARMENIA

SUMMARY

Key words: genotoxicity of environmental pollution, biomonitoring, genetic and epigenetic biomarkers, DNA damage, DNA methylation, micronuclei, bioindicator organisms, crayfish *Astacus leptodactylus*, snail *Helix lucorum*, *Darevskia* lizards, earthworm *Lumbricus terrestris*

The biomonitoring of environmental contaminants, including the assessment of their genotoxic effects, is of great importance in the system of environmental safety. The selection of optimal bioindicator organisms and effective biomarkers is an essential basis for biological monitoring. The aim of our research was to evaluate the effectiveness of genetic (DNA and chromosome damage) and epigenetic (DNA methylation) biomarkers in a range of aquatic and terrestrial bioindicator organisms for assessing water and soil pollution by genotoxicants.

Crayfish *A. leptodactylus*, snails *H. lucorum*, lizards of the genus *Darevskia* and earthworms *L. terrestris*, which are widely distributed in Armenia, were studied as bioindicators. The selection of genetic biomarkers is determined by their ability to serve as early warning signals of adverse effects of genotoxins that precede alterations in vital processes in the body.

In the study of Lake Sevan, crayfish from areas adjacent to the villages of Artanish and Tsapatagh showed increased levels of DNA damage compared with crayfish from a conditional control area at the mouth of the Masrik River, and these were correlated with the levels of Al, Fe and As in the water.

Snails living in the vicinity of the villages of Zuar and Hors, the towns of Yerevan and Kajaran have a higher level of DNA damage than snails from the conditional control point of Shikahogh, and this level correlates with the content of Cu, As and Mo in the soil. The digestive gland cells of the snails are more sensitive to pollutants than the haemocytes.

The level of DNA damage in the bisexual lizards *D. raddei* from Hrazdan and Yerevan and in the parthenogenetic lizards *D. armeniaca* from Hrazdan exceeded the values obtained at the conditional control points of Lchashen and Koghb and corresponded to the level of pollution of the habitats. DNA damage correlates with soil Cr, Cu and Mo content in *D. raddei* lizards and with soil Cr, Zn and Pb content in *D. armeniaca* lizards. The levels of DNA methylation decrease with increasing pollution and correlate with Cr, Cu, Zn, Mo and Pb in *D. raddei* lizards and with Cr, Zn, Cd and Pb in *D. armeniaca* lizards. DNA damage also correlates with As in juvenile *D. raddei* lizards, and the level of DNA methylation correlates with Mo in juvenile *D. armeniaca* lizards. The levels of micronuclei in *Darevskia* lizards did not exceed the conditionally control values, therefore the micronucleus test is not sensitive enough to assess the genotoxicity of soils. The levels of DNA damage and methylation in lizards are not sex-specific, but decrease with age. This does not contradict the literature data, that the decrease in DNA damage is an indicator of increased resistance to pollutants, and the decrease in DNA methylation is characteristic of ageing

in most organisms. Parthenogenetic lizards showed a higher sensitivity to environmental genotoxicants than bisexual lizards in the area where their habitats overlapped.

The levels of DNA damage in earthworms from the villages of Tsaghkunk and Zuar were comparable to those found in various species of earthworms from ecologically clean areas or grown in the laboratory on standard soil (according to the literature data).

The results obtained allow us to conclude that all the studied organisms are sensitive bioindicators for biomonitoring of water and soil genotoxicity. The most informative biomarkers for evaluating the genotoxicity of environmental pollutants have been proven to be DNA damage and methylation, assessed by the alkaline and methylation-sensitive versions of the comet assay.

For effective biomonitoring, it is necessary to take into account possible differences in tissue sensitivity to genotoxicants and the age-related manifestation of genetic and epigenetic effects. The results obtained demonstrate the combined genotoxic effect of a mixture of water and soil contaminants. Correlation analysis enabled the identification of several heavy metals that may have the greatest contribution to the formation of genetic and epigenetic effects.

Since it was revealed that the DNA damage in snails and lizards correlates with the contents of diverse metals in the soil, we recommend the combined use of different bioindicators to detect a wider range of genotoxic contaminants. The choice of parthenogenetic lizards for monitoring is preferable due to their higher sensitivity to environmental contaminants and more limited inter-individual variability compared to bisexual species. Indicators of genetic and epigenetic effects in lizards also correlate with pollutant concentrations, necessitating the combination of different biomarkers.

Thus, the results obtained allow us to recommend the use of bioindicators widely distributed in Armenia – crayfish, snails, lizards and especially their parthenogenetic species and earthworms – and the assessment of DNA damage and methylation as biomarkers for the monitoring of genotoxic pollutants in their habitat.

