ОЦЕНКА СТЕПЕНИ УСТОЙЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ (*HELIX POMATIA*) К ДЕЙСТВИЮ ГЕНОТОКСИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ

Э.А. Снегин, О.Ю. Артемчук

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
РФ, г. Белгород, ул. Победы, 85
E-mail: snegin@bsu.edu.ru, ris-med@yandex.ru

На основе метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) изучен уровень разрушения ДНК в четырех адвентивных популяциях виноградной улитки (*Helix pomatia* L.), обитающих в г. Белгород и его окрестностях. Полученные данные свидетельствуют о повышении индекса ДНК-комет в колонии, подверженной действию пестицидов и выхлопных газов автотранспорта (пос. Майский, ИДК = $0,305 \pm 0,070$). Кроме того, в этой колонии отмечен наибольший процент клеток, находящихся в состоянии апоптоза $6,0 \pm 0,5\%$. Выдвигается предположение, согласно которому накопление генотоксичных компонентов в данном биотопе вызывает нарушение цитогенетической стабильности, сбой в работе репарационных процессов в клетках обитающих здесь улиток и увеличение разрывов в цепи ДНК.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, городская среда, наземный моллюск, генотоксичные поллютанты.

Поступила в редакцию: 13.06.2018. После доработки: 18.07.2018.

Введение. В настоящее время существуют многочисленные методики, которые позволяют оценивать повреждения в молекуле ДНК, индуцированные физическими или химическими факторами. Одним из наиболее перспективных является метод гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет), который обладает необходимой точностью и специфичностью [1]. Привлекает высокая чувствительность и универсальность метода, что делает его широко применяемым в различных областях и для разнообразных исследований, от проверки на токсичность лекарственных препаратов до исследования пищевых упаковок, контактирующих с продуктами питания [2–4].

В последние годы методу ДНК-комет отводится особая роль в области экологического мониторинга, т.к. он позволяет определить степень мутагенного давления на природную среду. В качестве организмов-индикаторов антропогенно-

го давления на среду, наряду с другими видами, выступают наземные моллюски, т.к. их низкая подвижность и относительно долгий срок жизни способствуют накоплению в тканях различных поллютантов. Это позволяет оценить степень генотоксичного воздействия на их популяции и природные биотопы [5, 6].

Материал и методика. Для анализа нами было исследовано по 10 особей адвентивного вида *Helix pomatia* L. (виноградная улитка), отобранных из популяций, обитающих в г. Белгород и его окрестностях: «Майский», «Белгород», «Шопино», «Донец». Более подробное описание пунктов можно найти в нашей предыдущей публикации [7]. В проведенных исследованиях животные анализировались в день сбора. Для анализа использовали ткань гепатопанкреаса. Мацерация проходила в фосфатосолевом буфере (рН 7.5) содержащем 20 mM EDTA- Na_2 и 10% ДМСО при температуре +4°C. Клеточные суспензии в со-

ставе легкоплавкой агарозы наносили на предметные стекла с агарозной подложкой при температуре +42°C. Лизис белков проходил два часа при температуре +4°C (лизирующий буфер: 10 mM Tris-HCl (pH 10), 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1% Triton X-100 и 10% ДМСО). Электрофорез проводили в темном помещении, применяя нейтральную версию метода с использованием трис-ЭДТА-боратного буфера (pH 8,9; 20 мин; 1 в/см). Фиксированные спиртом и высушенные препараты окрашивали красителем SYBR Green I. Анализ изображений проводился на эпифлуоресцентном микроскопе. Данные обрабатывались при помощи программы CometScore™ v 1.5¹. Ядра ранжировались по четырем стадиям разрушения ДНК. На каждом препарате учитывалось не менее 100 ядер.

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

$$\text{ИДК} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

где n₀-n₄ – число «ДНК-комет» каждого типа; Σ – сумма подсчитанных «ДНК-комет» [8].

Далее ранжировали клетки по четырем стадиям разрушения (от 0 до 4) подсчитывали количество клеток на каждой стадии. На основе полученных данных рассчитывали индекс ДНК-комет. Также оценивали количество клеток в состоянии апоптоза.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным во всех исследованных популяциях ИДК не превысил первой стадии разрушения (табл. 1), что свидетельствует с одной стороны об отсутствии в биотопах поллютантов, ак-

тивно влияющих на ДНК улиток, что весьма сомнительно, т.к. большинство изученных групп находятся в урбанизированной среде. С другой стороны, этот факт говорит об эффективной работе репаративной системы у *H. pomatia*. Тем не менее, достоверные различия между сравниваемыми популяциями по уровню разрушения ДНК все же наблюдаются. Об этом свидетельствуют результаты однофакторного дисперсионного анализа, проведенного по ИДК (табл. 2).

Полученные данные показывают, что между популяциями виноградной улитки наблюдаются достоверные различия по индексу ДНК-комет (при $P=0,003$). Об этом же говорят результаты попарного сравнения средних показателей ИДК (табл. 3, рис. 1). Особенно сильно дистанцируется от остальных групп популяция из поселка Майский, где отмечены самые большие значения ИДК ($0,305 \pm 0,070$). В остальных группах эти показатели были меньше («Донец» – $0,036 \pm 0,020$; «Шопино» – $0,126 \pm 0,056$; «Белгород» – $0,136 \pm 0,031$).

Аналогичный результат был получен при сопоставлении популяций виноградной улитки по проценту клеток, находящихся в состоянии апоптоза. Наибольшее количество таких клеток было отмечено в выборке из группы «Майский» ($6,0 \pm 0,5\%$), немного меньше в выборке «Белгород» ($4,9 \pm 0,5\%$). Достоверно им уступили выборки «Донец» ($1,0 \pm 0,3\%$) и «Шопино» ($0,2 \pm 0,1\%$).

Стоит отметить, что популяция «Майский», где отмечены наибольшие показатели разрушения ДНК, обитает в лесополосе, примыкающей к сельскохозяйственным угодьям, где выращивается пшеница, и регулярно распыляются пестициды. Кроме того, вдоль данной лесополосы на расстоянии 10 м проходит оживленная автомагистраль «Белгород-Харьков». Все это, вероятно вызывает накопление генотоксичных компонентов в данном биотопе, следствием чего явля-

ется нарушение цитогенетической стабильности, сбой в работе репарационных процессов в клетках обитающих здесь улиток и увеличение разрывов в цепи ДНК.

Вместе с тем, факт присутствия этого адвентивного вида на данной террито-

рии, как в других участках г. Белгорода, свидетельствует в пользу устойчивости генетического аппарата виноградной улитки к действию поллютантов урбанизированной среды и создает предпосылки для дальнейшего развития инвазионного процесса.

Таблица 1. Результаты анализа ДНК-комет в популяциях *Helix pomatia*

Пункт	Показатели	№ пробы									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Майский	<i>N</i>	197	106	107	120	155	285	155	105	122	130
	<i>Na</i>	5	3	3	14	9	19	0	19	8	7
	0 степень	160	84	86	97	142	224	155	58	84	115
	1 степень	5	6	6	3	0	15	0	6	4	2
	2 степень	6	1	2	4	3	6	0	5	7	3
	3 степень	20	3	8	2	1	14	0	15	18	3
	4 степень	1	9	2	0	0	7	0	2	1	0
	ИДК	0,411	0,5	0,392	0,142	0,058	0,340	0	0,657	0,623	0,131
Донец	<i>N</i>	104	253	124	102	120	146	103	123	100	101
	<i>Na</i>	4	0	0	2		8	0	0	0	0
	0 степень	97	253	119	100	120	138	92	123	100	93
	1 степень	3	0	5	0		0	7	0	0	7
	2 степень	0	0	0	0		0	0	0	0	0
	3 степень	0	0	0	0		0	4	0	0	0
	4 степень	0	0	0	0		0	0	0	0	1
	ИДК	0,029	0	0,040	0	0	0	0,184	0	0	0,109
Шопино	<i>N</i>	100	100	111	100	100	103	100	101	100	100
	<i>Na</i>	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0
	0 степень	100	100	81	100	90	90	100	96	100	98
	1 степень	0	0	8	0	0	1	0	0	0	0
	2 степень	0	0	12	0	4	5	0	0	0	0
	3 степень	0	0	8	0	5	7	0	4	0	2
	4 степень	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	ИДК	0	0	0,504	0	0,270	0,311	0	0,119	0	0,060
Белгород	<i>N</i>	198	477	234	105	174	133	101	185	199	102
	<i>Na</i>	16	0	4	2	63	2	8	0	0	0
	0 степень	162	472	215	100	100	118	76	179	180	85
	1 степень	13	3	2	0	4	7	5	6	16	13
	2 степень	5	1	10	3	6	1	6	0	3	4
	3 степень	0	1	3	0	1	4	6	0	0	0
	4 степень	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	ИДК	0,157	0,017	0,133	0,057	0,109	0,188	0,346	0,032	0,111	0,206

Примечание: *N* – количество проанализированных клеток; *Na* – количество клеток в состоянии апоптоза.

Таблица 2. Результаты однофакторного дисперсионного анализа популяций *Helix pomatia* по ИДК

Источник вариации	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Между группами	0,485	3	0,162	5,41	0,003
Внутри групп	1,106	37	0,030		
Итого	1,591	40			

Таблица 3. Значения критерия Фишера при попарном сравнении популяций *Helix pomatia* (под диагональю по ИДК, над диагональю по апоптозу)

Пункты	Майский	Донец	Шопино	Белгород
Майский		62,4*	103,3*	1,94
Донец	12,5*		6,9*	47*
Шопино	3,8	2,3		85,3*
Белгород	4,6*	7,4*	0,021	

Примечание: * достоверные значения при $P < 0,05$

Рис. 1. Средние значения ИДК в популяциях *Helix pomatia* ($M \pm m$)

Заклучение. Таким образом, используя метод ДНК-комет, было продемонстрировано достоверное увеличение степени разрушения генетического аппарата в популяциях адвентивного вида *H. pomatia* в условиях урбанизированных территорий, подверженных воздействию различного рода поллютантов антропогенного происхождения. Выявленная тенденция может послужить отправ-

ной точкой для дальнейшего мониторинга исследуемых групп улиток, включающих, как цитогенетические, так и демографические данные. Полагаем, что полученный результат позволит использовать метод щелочного гелеэлектрофореза в биоиндикационных целях, где будут задействованы не только представители малакофауны, но и другие виды животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1984. Vol. 123, № 1. P. 291–298.
2. Середенин С.Б., Дурнев А.Д. Фармакологическая защита генома. М.: ВИНТИ, 1992. 161 с.
3. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. 2008. Т. 10, № 3. С. 303–309.
4. Тронов В.А., Пелевина И.И. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применения метода // Цитология. 1996. Т. 38. № 4/5. С. 71–75.
5. Снегин Э.А., Ненашева Е.С., Артемчук О.Ю. Оценка степени повреждения ДНК в популяциях наземных моллюсков урбанизированных ландшафтов Среднерусской возвышенности // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. 2011. Вып. 17, № 21 (116). С. 26–30.
6. Снегин Э.А. Оценка цитогенетической стабильности в природных популяциях наземных моллюсков (на основе метода ДНК-комет) // Онтогенез. 2014. Т. 45, № 3. С. 180–186.
7. Снегин Э.А., Артемчук О.Ю. Морфогенетический анализ популяций *Helix pomatia* L. (Pulmonata, Helicidae) юго-восточной и восточной части современного ареала // Экологическая генетика. 2014. Т. XII, № 4. С. 25–37.
8. Struwe M., Greulich K. O., Suter W. et al. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro // Mutation Research. 2007. Vol. 632, Iss. 1-2. P. 44–57.

ESTIMATION OF A DEGREE OF STABILITY OF ROMAN SNAILS (*HELIX POMATIA*) POPULATIONS TO THE ACTION OF GENOTOXIC COMPONENTS OF THE URBAN ENVIRONMENT

E.A. Snegin, O.Yu. Artemchuk

Belgorod National Research University,
Russia, Belgorod, Pobeda St. 85

Based on the method of alkaline gel electrophoresis of isolated cells (Comet Assay for DNA), the level of DNA destruction in four adventive populations of Roman snail (*Helix pomatia* L.), inhabiting the city of Belgorod and its environs, was studied. The data obtained indicate an increase in the index of DNA comets in a colony prone to pesticides and vehicle exhaust fumes (Maisky settlement, IDK = 0.305 ± 0.070). In addition, this colony has the highest percentage of cells in the state of apoptosis, $6.0 \pm 0.5\%$. It is suggested that the accumulation of genotoxic components in a given biotope causes a disturbance of cytogenetic stability, disruptions in the work of repair processes in the cells of snails living here, and an increase in gaps in the DNA chain.

Keywords: DNA comet method, urban environment, terrestrial mollusk, genotoxic pollutants.