

Биол. журн. Армении, 4 (64), 2012

ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ЭРИТРОЦИТАХ РЫБ ИЗ РАЗНЫХ ВОДОЕМОВ АРМЕНИИ МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

Г.Г. ОГАНЕСЯН¹, А.Э. СИМОНЯН¹, Б.К. ГАБРИЕЛЯН²,
С.Г. МИНАСЯН³, Р.М. АРУТЮНЯН¹

¹ЕГУ, кафедра генетики и цитологии,

hovgalina@list.ru, genetanatgc@yahoo.com, rouben_a@hotmail.com

²Институт зоологии НАН Армении, gabrielb@sci.am

³Центр мониторинга воздействия на окружающую среду

Министерства охраны природы РА,

seyran_minasyan@yahoo.com

Повреждения ДНК у рыб являются чувствительными биомаркерами генотоксического действия загрязнителей окружающей среды. Проведена сравнительная оценка уровней повреждений ДНК в эритроцитах карасей (*Carassius auratus gibelio*), обитающих в различных участках оз. Севан, методом ДНК-комет. Достоверное повышение уровня повреждений ДНК обнаружено у рыб из устьев рек Гаварагет и Дзкнагет, по сравнению с рыбами из оз. Севан. Одним из основных результатов работы явилось выявление достоверной положительной корреляции между уровнями повреждений ДНК у рыб и содержанием различных химических соединений в исследованных водоемах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод ДНК-комет является чувствительным, эффективным и быстрым тестом для идентификации экогенотоксикантов, а карась является чувствительным биоиндикатором оценки загрязненности водоемов Армении.

Загрязнение водной среды – генотоксичность – метод ДНК-комет

ԴՆԹ-ի վնասվածքները ձկների մոտ ջրային միջավայրի աղտոտիչների գենաթունային ազդեցության զգայուն կենսամարկերներ են: Կատարվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակի համեմատական գնահատում Սևանա լճի տարբեր կետերում բնակվող կարասի (*Carassius auratus gibelio*) էրիթրոցիտներում ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով: Հայտանբերվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների հավաստի բարձրացում Գավառագետի և Ձկնագետի ջրերում բնակվող ձկների մոտ, համեմատած Սևանա լճի ձկների հետ: Աշխատանքի հիմնական արդյունքներից է եղել ձկների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների և ջրի քիմիական բաղադրության միջև դրական կորելյացիայի հայտնաբերումը: Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ ԴՆԹ-կոմետ մեթոդը հանդիսանում է արդյունավետ և արագ թեստ գենաթունային միացությունների գնահատելու համար, իսկ կարասը զգայուն կենսաինդիկատոր է Հայաստանի ջրավազանների աղտոտվածությունը գնահատելու առումով:

Ջրային միջավայրի աղտոտվածություն – գենաթունային ազդեցություն – ԴՆԹ-կոմետ մեթոդ

DNA damage in fish can be used as sensitive biomarkers of genotoxic action of environmental contamination. The goal of this study was the comparative assessment of levels of DNA damage in erythrocytes of fish (*Carassius auratus gibelio*), living in certain parts of Lake Sevan, by the comet assay. A significant increase of the level of DNA damage in fish from the Rivers Gavaraget and Dznaget compared to DNA damage in fish from Lake Sevan was revealed. One of the basic results

of the study was the detection of the positive correlation between the DNA damage in fish and the results of the chemical analysis of water. The obtained results show, that the application of the comet assay in erythrocytes of *Carassius auratus gibelio*, is an efficient, fast and sensitive method for the estimation of genotoxicity of water bodies of Armenia.

Water pollution – genotoxicity – comet assay

Повышение уровня загрязненности водоемов вызывает негативные изменения у водных организмов, а также прямо или косвенно вредит здоровью человека [10]. Загрязнители окружающей среды могут вызывать повреждения генома, идентификация которых позволяет контролировать уровень загрязненности и оценивать последствия их влияния на живые организмы и экосистемы в целом.

Одним из эффективных методов мониторинга широкого спектра повреждений ДНК, вызванных факторами окружающей среды, является метод ДНК-комет или гель-электрофореза лизированных единичных клеток. Метод позволяет оценивать повреждения и репарацию ДНК на уровне отдельных клеток и может быть применен для оценки интегральной целостности генома [4].

Метод ДНК-комет основан на регистрации уровня миграции поврежденной ДНК, содержащей одонитевые и двунитевые разрывы, в электрическом поле, в результате которой образуется напоминающая комету структура. Количество ДНК, мигрировавшей по направлению к аноду, может являться показателем уровня повреждений его в изучаемых клетках. Преимуществами метода ДНК-комет являются возможность оценки повреждений ДНК в любых клеточных популяциях, небольшое количество экспериментального материала, а также отсутствие необходимости в наличии пролиферирующих клеток [18]. В последние годы метод ДНК-комет был успешно применен для оценки повреждений ДНК у разных растительных и животных организмов [6, 8, 9], в том числе у рыб [5].

Рыбы считаются наиболее адекватным объектом для оценки загрязнителей воды с мутагенным и канцерогенным потенциалом, поскольку метаболизируют и накапливают в организме содержащиеся в воде химические соединения. Так как рыбы реагируют на токсические соединения аналогично высшим позвоночным, они могут применяться для скрининга химических соединений, потенциально мутагенных и канцерогенных для человека [1].

По данным литературы, уровень повреждений ДНК у обитающих в воде организмов является быстрым и чувствительным индикатором загрязнения среды. Обнаружена зависимость уровня повреждений ДНК в эритроцитах рыб *Cyprinus carpio*, обитающих в реках Бразилии, от уровня их загрязненности [15]. Выявлена корреляция между загрязненностью озера, расположенного в районе метрополитена в Бразилии, и повышением уровня повреждений ДНК у рыб *Tilapia rendalli* [11]. На основе результатов оценки уровня повреждений ДНК в клетках крови, жабер и печени методом ДНК-комет было показано, что рыба *Squalius cephalus* L. 1758, обитающая в реках Сербии, представляет собой эффективную модель мониторинга водных экосистем. Показано, что жабры являются наиболее чувствительным, а кровь – наименее чувствительным биоиндикатором, вероятно, в связи с регулярным обновлением ее состава, и, таким образом, могут применяться преимущественно при высоких уровнях загрязнения [17]. Повышенный уровень повреждений ДНК был обнаружен в клетках крови *Cyprinus carpio*, обитающей в оз. Моган в Турции, где локализована канализационная система города и куда сбрасываются пестициды, используемые в сельском хозяйстве. Исследования показывают, что оз. Моган может быть загрязнено веществами, которые вызывают генотоксические эффекты [3].

Целью нашей работы была разработка биомаркеров генетического мониторинга загрязненности водоемов Армении. Для ее реализации уровни повреждений ДНК в эритроцитах карасей (*Carassius auratus gibelio*), обитающих в оз. Севан, у полуострова оз. Севан, в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет, были оценены методом ДНК-комет и сопоставлены с данными о содержании в этих водоемах различных химических соединений.

Материал и методика. *Тестируемые животные.* Повреждения ДНК оценивали в эритроцитах семи карасей (*C. auratus gibelio*) из оз. Севан, шести карасей из вод вблизи полуострова оз. Севан, пяти карасей из устья р. Гаварагет и шести карасей из устья р. Дзкнагет (рис. 1). Возраст рыб варьировал от 4 до 6 лет.

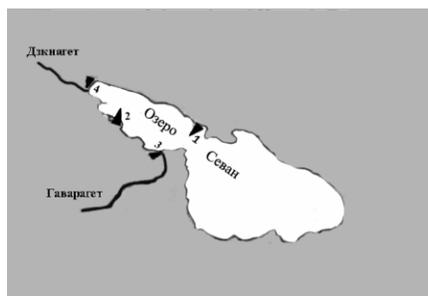


Рис. 1. Водоемы Армении с указанием локализаций мест биомониторинга рыб

Точки на карте

- ❖ 1 - к югу от села Шоржа (оз. Севан-контрольная группа)
- ❖ 2 - полуостров оз. Севан
- ❖ 3 - устье р. Гаварагет
- ❖ 4 - устье р. Дзкнагет

Образцы крови брались от каждой рыбы из сердца (*dorsal aorta*) или хвостовой вены (*caudal venous*). Гепаринизированная кровь разбавлялась PBS (phosphate-buffered saline) в соотношении 1:50.

Рыбы для экспериментальных исследований были любезно предоставлены Научным Центром зоологии и гидроэкологии НАН РА.

Метод ДНК-комет. В работе использовалась щелочная модификация метода комет [16] с небольшими модификациями.

Предметные стекла, покрытые слоем 1%-ного раствора агарозы, оставляли на ночь в термостате при 37°C для затвердевания. 10 мкл разбавленной в PBS крови с гепарином (1:50) смешивали с 90 мкл раствора легкоплавкой агарозы (LMA). 100 мкл смеси клеток с LMA капали на предметные стекла. Препараты оставляли на 10 мин при 4°C для затвердевания второго слоя и помещали в лизирующий раствор (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Трис, pH 10.0 с Тритоном X-100) на 1 ч при 4°C для разрушения протеинов и клеточных мембран. По окончании лизиса препараты погружали в аппарат для электрофореза, содержащий щелочной буфер (300 mM NaOH и 1 mM ЭДТА), на 20 мин для раскручивания цепей ДНК. Электрофорез проводили при напряжении 26 В и силе тока 300 мА в течение 15 мин. После электрофореза препараты промывали нейтрализационным буфером (0.4 мкг/мл Трис, pH 7.5) и окрашивали бромистым этидием (4 мкг/мл).

Автоматический анализ изображений комет проводили с применением коммерческой программы Comet Assay VI. Регистрировали два параметра повреждений ДНК – % ДНК в хвосте кометы и момент хвоста Оливе, равный произведению расстояния от центра ядра до центра плотности хвоста кометы на % ДНК в хвосте [13, 14].

Статистическая обработка данных была проведена с применением непараметрического теста Манна-Уитни и корреляционного анализа статистической программой Statgraphics PLUS 2.1.

Результаты и обсуждение. Уровни повреждений ДНК в эритроцитах карасей из оз. Севан, вод полуострова оз. Севан, устья рек Гаварагет и Дзкнагет оценивали методом ДНК-комет по параметрам % ДНК в хвосте кометы и момент хвоста Оливе. Полученные результаты предствлены на рис. 2 и 3 и в табл. 1. Оз. Севан является наименее загрязненным водоемом Армении, поэтому группа рыб из оз. Севан рассматривалась как контрольная.

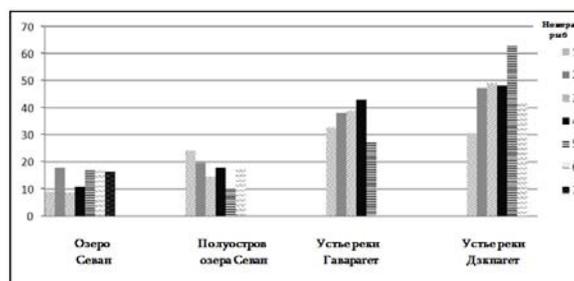


Рис. 2. Уровни повреждений ДНК (% ДНК в хвосте кометы на оси ординат) у рыб, обитающих в оз. Севан, у полуострова оз. Севан и в устьях рр. Гаварагет и Дзкнагет

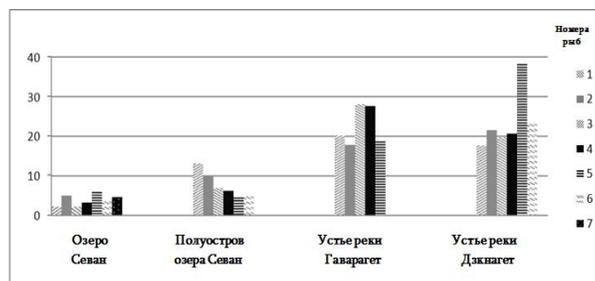


Рис. 3. Уровни повреждений ДНК (момент хвоста Оливе на оси ординат) у рыб, обитающих в оз. Севан, у полуострова оз. Севан и в устьях рр. Гаварагет и Дзкнагет

Обнаружено достоверное повышение уровня повреждений ДНК у рыб, обитающих в устьях рр. Гаварагет и Дзкнагет, по сравнению с контролем по параметрам %ДНК в хвосте и момент хвоста Оливе.

У рыб, обитающих в водах полуострова оз. Севан, повышения уровня повреждений ДНК по сравнению с контролем не обнаружено (табл. 1).

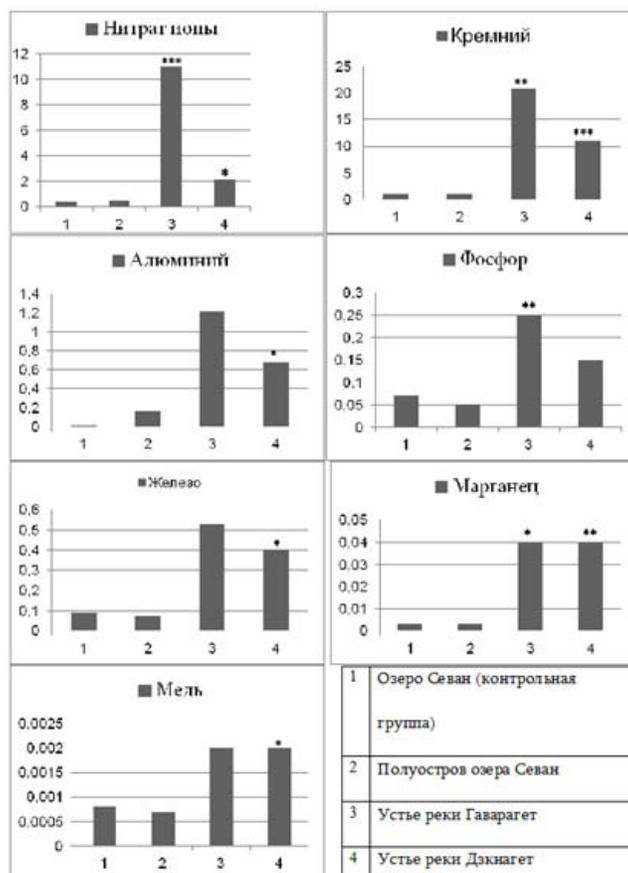
Табл. 1. Средние уровни повреждений ДНК в группах рыб, обитающих в оз. Севан, у полуострова оз. Севан и в устьях рр. Гаварагет и Дзкнагет

Среда обитания	Количество рыб	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
		Среднее ± ст. ошибка	Медиана	Среднее ± ст. ошибка	Медиана
Оз. Севан (контрольная группа)	7	13,88±1,19	9,24	3,89±0,39	2,49
Полуостров оз. Севан	6	17,36±1,49	13,17	7,63±0,82	5,19
Устье р. Гаварагет	5	35,99±2,28	29,87*	22,48±1,89	14,97*
Устье р. Дзкнагет	6	46,69±1,95	43,33*	23,52±1,41	19,24*

* $p < 0.01$ достоверная разница с контролем

С целью идентификации генотоксических соединений, вызывающих повышение уровней повреждений ДНК, были проанализированы данные химического анализа воды в четырех точках оз. Севан, которые совпадают с зонами отлова рыб, за 6-летний период (2006-2011гг.), любезно предоставленные Армянским центром мониторинга окружающей среды. Выбор этого периода времени был обусловлен возрастом рыб, который варьировал от 4 до 6 лет, таким образом действие химических элементов учитывалось в течение всей продолжительности их жизни.

Сравнительный анализ содержания загрязнителей в четырех водоемах показал, что в устье р. Гаварагет содержание нитрат ионов, кремния, фосфора и марганца достоверно выше контрольного уровня (в оз. Севан). В устье р. Дзкнагет содержание нитрат ионов, кремния, алюминия, железа, марганца и меди достоверно превышает контрольный уровень. В водах полуострова оз. Севан содержание всех отмеченных элементов не превышает контрольный уровень (рис. 4).



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ достоверная разница с контролем

Рис. 4. Химические показатели качества воды в исследованных водоемах Армении за период времени с 2006 по 2011 гг. по сравнению с контролем (оз. Севан).

Обнаружена достоверная корреляция между уровнями повреждений ДНК (% ДНК в хвосте кометы) и уровнем содержания меди ($r=0,98$, $p=0,02$), а также между уровнями повреждений ДНК (момент хвоста Оливе) и уровнем содержания железа ($r=0,94$, $p=0,049$) и марганца ($r=0,98$, $p=0,02$).

Полученные данные позволяют предположить, что повышенное содержание меди, железа и марганца в рр. Гаварагет и Дзкнагет может вызывать повышение уровня повреждений ДНК в эритроцитах рыб.

Среди загрязнителей окружающей среды металлы вызывают особую озабоченность в связи с их потенциальным токсическим эффектом и способностью к биоаккумуляции в водных экосистемах. По данным литературы, генотоксичность меди и цинка показана при раздельном и совместном действии у двух видов рыб *Synodontis clarias* и *Tilapia nilotica* с использованием микроядерного теста [12], медь вызывает повышение уровня микроядер у рыбы *Oncorhynchus mykiss* [2]. Повышение уровня повреждений ДНК в эритроцитах рыбы *Prochilodus lineatus* при действии алюминия показано методом ДНК-комет [7]. Возможным механизмом токсичности железа может быть индукция повреждений ДНК за счет генерации свободных радикалов кислорода, которые могут стать причиной сайт-специфичных окислительных повреждений [20]. Несмотря на широкую распространенность, роль марганца в пресноводных экосистемах пока мало изучена и знания о механизмах его токсического действия на рыб ограничены. Исследования на рыбах *Carassius auratus* показали, что марганец вызывает окислительный стресс [18].

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о повышении уровня повреждений генома у водных организмов в условиях повышенного содержания меди, железа и марганца в водной среде и подтверждают целесообразность применения рыб для генетического мониторинга. На основе полученных данных можно заключить, что метод ДНК-комет является чувствительным и эффективным подходом для оценки экогенотоксичности водной среды, а карась (*Carassius auratus gibelio*), обитающий в водоемах Армении, может служить чувствительным биоиндикатором оценки их загрязненности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ali F. K., El-Shehawi A.M., Seehy M.A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. African Journal of Biotechnology, 7, 606-612, 2008.
2. Bagdonas E., Vosyliene M.Z. A Study of Toxicity and Genotoxicity of Copper, Zinc and their Mixture to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biologija, 1, 8-13, 2006.
3. Cok I., Ulutaş O.K., Okuşluk O., Durmaz E., Demir N. Evaluation of DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by comet assay for determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara). Scientific World Journal, 11, 1455–1461, 2011.
4. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Molecular Biotechnology, 26, 249-261, 2004.
5. de Andrade V.M., de Freitas T, da Silva J. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. Mutat. Res., 560, 57-67, 2004.
6. Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutat. Res., 681, 80-92, 2009.
7. Galindo B.A., Troilo G., Cólus I.M.S., Martinez C.B.R., Sofia S.H. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Water, air and soil pollution, 212, 419-428, 2010.
8. Gichner T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco. Cellular and acellular Comet assays. Mutat. Res., 535, 187-193, 2003.

9. *Heaton P.R.* Application of Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *J. Nutr.*, 132, 1598–1603, 2002.
10. *Jha A.* Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221, 2008.
11. *Lemos D.S., Mantovani M.S.* Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 197-201, 2005.
12. *Obiakor M.O., Okonkwo J.C., Ezenonyeaku C.D., Ezenwelu C.O.* Genotoxicology: Single and Joint Action of Copper and Zinc to *Synodontis clarias* and *Tilapia nilotica*. *Appl. Sci. Environ. Manage.*, 14, 59-64, 2010.
13. *Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E.* Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay". *Radiat. Res.*, 122, 86-94, 1990.
14. *Olive P.L., Wlodek D., Durand R.E., Banath J.P.* Factors influence DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.*, 198, 259-260, 1992.
15. *Rajaguru P., Suba S., Palanivel M., Kalaiselvi K.* Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41, 85-91, 2003.
16. *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. *Exp. Cell Res.*, 175, 184–191, 1988.
17. *Sunjog K., Kolarević S., Gačić Z., Mičković B., Nikčević M., Knežević-Vukčević J., Lenhardt M., Vuković-Gačić B.* Ecogenotoxicity analysis with Comet Assay in different tissues of chub (*Squalius cephalus* L.1758). In Proceedings of the BALWOIS Conference, pp. 1–5, Ohrid, Macedonia, 2012.
18. *Tice R.R., Agurell, E., Anderson, D.* The comet assay: applications in nutraceutical research for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221, 2000.
19. *Vieira M.C., Torronteras R., Córdoba F., Canalejo A.* Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 78, 212-217, 2012.
20. *Vuori K.M.* Direct and indirect effects of iron on river ecosystems. Finnish zoological and botanical Publishing board Fennici, 32, 317-329, 1995.

Поступила 21.08.2012