ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS

Հատոր Том Volume 120 2020 № 3

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 574.3:539.1.04:577.123:595.1:58.051

А. А. Саргсян

Оценка повреждений ДНК с применением метода ДНК-комет в двух природных популяциях дождевых червей *Lumbricus terrestris*

(Представлено чл.-кор. НАН РА Р. М. Арутюняном 22/VII 2020)

Ключевые слова: *дождевые черви, биоиндикаторы, повреждения ДНК, метод ДНК-комет.*

Введение. Дождевые черви представляют собой одну из многочисленных групп животных, распространенных во всех наземных экосистемах, и являются чувствительными биоиндикаторами экологического состояния почвенной среды [1]. Дождевые черви *Eisenia fetida и Eisenia andrei* применяются в качестве стандартных моделей для мониторинга загрязнения окружающей среды на основе оценки острой токсичности при содержании в исследуемой почве в лабораторных условиях [2]. Различные виды дождевых червей, обитающих в природных условиях, также применяются как биоиндикаторы загрязнения почв. В частности, чувствительным биоиндикатором является вид *Lumbricus terrestris*, который был применен для оценки органических и неорганических загрязнителей на основе сублетальной токсичности, клеточных и биохимических биомаркеров [3, 4], а также аккумуляции металлов в тканях [5, 6].

Одним из наиболее серьезных последствий действия загрязнителей среды является формирование повреждений ДНК. Для оценки генетических эффектов широко используется метод ДНК-комет, который позволяет оценивать повреждения и репарацию ДНК у различных организмов. Основным преимуществом метода ДНК-комет являются его высокая чувствительность и возможность детекции повреждений на уровне единичных клеток [7]. На разных видах дождевых червей показана эффективность применения метода ДНК-комет [9-17]. В двух исследованиях метод ДНК-комет был применен к *L. terrestris* [18, 19].

Целью данного исследования была оценка возможности применения червей *L. terrestris* для биомониторинга загрязнения почвы генотосикантами на территории Армении и Арцаха. Протоколы выделения целомоцитов и метод ДНК-комет были адаптированы для *L. terrestris.* Спонтанный уровень повреждений ДНК был оценен в целомоцитах червей, обитающих на относительно экологически чистых территориях.

Материал и методика. Повреждения ДНК оценивали в целомоцитах дождевых червей *L. terrestris,* обитающих на территориях сел Цахкунк (Армавирская область, Армения) и Зуар (Шаумяновский район, Арцах). Основным источником загрязнения на этих участках является сельскохозяйственная деятельность. Из каждой популяции было отобрано по 6 особей. Червей вручную выбирали из субстрата и транспортировали в лабораторию в контейнерах.

Целомоциты были выделены с использованием неинвазивного метода [8, 9] с некоторыми модификациями. Дождевых червей промывали холодной водопроводной водой для удаления частиц почвы и помещали в стерильную чашку Петри. Одна четверть задней части тела была подвергнута массажу для удаления содержимого нижней кишки. Затем каждого дождевого червя помещали в пробирки и добавляли 1 мл экстракционного буфера, содержащего 5% этанола и 95% PBS (pH 7.4) с добавлением 2.5 мг/мл EDTA. Этанол добавляли в экстракционный буфер непосредственно перед выделением клеток. Животных инкубировали в экстракционном буфере в течение 3 мин при комнатной температуре, под воздействием которого через поры происходила секреция целомической жидкости, содержащей целомоциты. После этого черви были промыты в воде и помещены обратно на субстрат. 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. После процедуры экстракции клеточные суспензии хранили на льду.

Для оценки повреждений ДНК применяли щелочную версию метода ДНК-комет [20]. На предметные стекла, покрытые слоем 1%-ного раствора агарозы, раскапывали смесь 20 мкл суспензии целомоцитов с 80 мкл легкоплавкой агарозы (LMA). Полученные препараты помещали в лизирующий раствор (2.5 M NaCl, 100 мМ Na_2EDTA, 10 мМ Tris и 1% Triton X-100, pH 10.0) на 18 ч при 4^0C. После лизиса препараты погружали в щелочной буфер (300 мМ NaOH и 1 мМ Na_2EDTA, 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 15 мин нейтрализационным буфером (0.4 M Tris, pH 7.5) и окрашивали бромистым этидием (20 мкг/мл). Изображения комет анализировали на флуоресцентном микроскопе ZEISS (Германия). Оценку % ДНК в хвосте кометы, момента хвоста кометы и длины хвоста кометы проводили с применением программы Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). Для каждого дождевого червя анализировали по 150 клеток. Статистическую обработку дан-

ных проводили с помощью программы Statgraphics Centurion 16.2 (StatPoint Technologies, Inc. USA; Warrenton, VA) с применением непараметрического теста Манна – Уитни и теста Краскела – Уоллиса.

Результаты исследований и их обсуждение. *L. terrestris* – один из видов дождевых червей, широко распространённых по всему миру, в том числе в Армении и Арцахе. В Армении дождевые черви в качестве биоиндикаторов в экогенотоксикологических исследованиях до сих пор не использовались.

Эффективность метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК у различных видов животных, вызванных загрязнителями окружающей среды, показана во многих исследованиях (см. обзорные публикации [21, 22]). Согласно [18] и [19] использование метода ДНК-комет на целомоцитах дождевых червей *L. terrestris* может быть удобным инструментом для мониторинга генотоксичности загрязнения почвы.

Для оценки возможности применения *L. terrestris* для биоиндикации генотоксического загрязнения почв в Армении и Арцахе спонтанный уровень повреждений ДНК оценивали у животных, обитающих в относительно экологически чистых районах сел Цахкунк и Зуар, методом ДНК-комет. На этих территориях население занимается скотоводством и земледелием, другие антропогенные источники загрязнения отсутствуют.

На первом этапе исследования было проведено выделение целомоцитов *L. terrestris* с применением двух типов экстракционных буферов [8, 9], двух вариантов центрифугирования [23, 24] и двух вариантов промывания клеток раствором PBS [9, 25]. Также были испробованы две модификации метода ДНК-комет при разной продолжительности лизиса [9, 19]. Анализ различных сочетаний экспериментальных условий, представленных в табл. 1, позволил выбрать варианты, наиболее оптимальные для *L. terrestris.*

Таблица 1

Модификации выделения целомоцитов и метода ДНК-комет у различных видов дождевых червей

Выделение целомоцитов		
Солевой буфер	5% этанол и 95% солевой буфер (0.85 г NaCl + 100 мл dH_2O) с добавлением 2.5 мг/мл EDTA [8]	5% этанол и 95% солевой буфер (PBS, pH 7.4) с добавлением 2.5 мг/мл EDTA [9]*
Центрифугирование	15 мин при 260 x g /10°C [23]	7 мин при 500 x g/4 °C [24]*
Промывание клеток раствором PBS	Три раза при 380xg/3 мин каждый [9]	Один раз при 400xg/10 мин [25]*
Метод ДНК-комет		
Продолжительность лизиса	1 ч [9]	18 ч [19]*

* Оптимальные для *L. terrestris* экспериментальные условия.

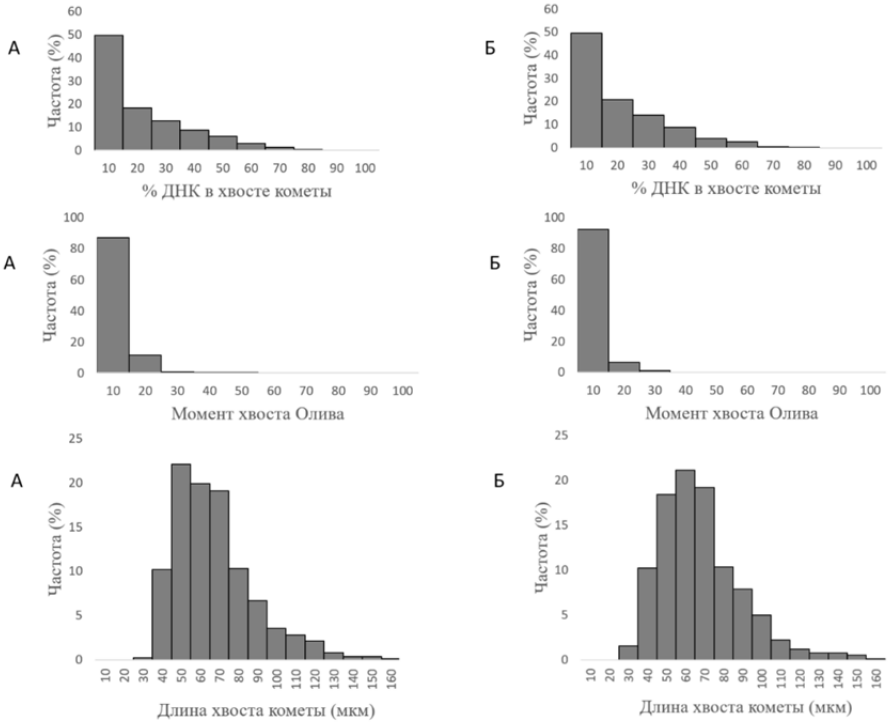

Рис. 1. Распределение частоты клеток по параметрам % ДНК в хвосте, момента хвоста Олива и длины хвоста кометы в целомоцитах *L. terrestris*, обитающих в селах Цахкунк (А) и Зуар (Б).

Таблица 2

Уровень повреждений ДНК (среднее ± ст. ошибка) в целомоцитах дождевых червей *L. terrestris*, обитающих в селах Цахкунк и Зуар

Среда обитания	Количество червей	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста Олива	Длина хвоста кометы, мкм
Цахкунк	6	15.41±0.55	4.32±0.17	64.41±0.87
Зуар	6	14.53±0.48	3.78±0.14	63.69±0.78

Результаты оценки уровней повреждений ДНК в целомоцитах червей *L. terrestris* представлены в табл. 2. Непараметрический тест Манна – Уитни показал, что уровни повреждений ДНК в целомоцитах дождевых червей из исследованных участков достоверно не отличаются между собой по всем трем параметрам комет ($p>0.05$).

Распределение клеток по параметрам %ДНК в хвосте кометы, момент хвоста Олива и длина хвоста кометы представлены на рис. 1. Статистически значимых различий в распределении клеток по уровням повреждения ДНК между червями из Цахкунка и Зуара также не обнаружено ($p>0.05$, тест Краскела – Уоллиса).

В обеих группах животных преобладают клетки с низким уровнем %ДНК в хвосте кометы (0-10) и момента хвоста Олива (0-10), форма распределений этих параметров крайне асимметричная. Распределение клеток по параметру длины хвоста кометы представлено кривой с правосторонней асимметрией, здесь преобладают клетки с средними значениями у червей из Цахкунка (40-50) и Зуара (50-60). Длина хвоста кометы пропорциональна размеру образованных фрагментов ДНК, что свидетельствует о преобладании фрагментов ДНК среднего размера.

В первой публикации о применении метода ДНК-комет к *L. terrestris* [18] был показан дозозависимый эффект при обработке *in vivo* физическими и химическими мутагенами. Уровень повреждений ДНК по параметру длины хвоста кометы в целомоцитах червей, содержавшихся в лабораторных условиях в стандартной экологически чистой почве и в образцах почв из незагрязненных территорий, составлял 20 и 55 мкм, соответственно, что согласуется с полученными нами результатами. Методом ДНК-комет было показано, что черви *L. terrestris*, обитающие в загрязненной мышьяком почве (Восточный Мидленд, Великобритания), приобретают устойчивость к его токсическому действию [19]. При этом уровень повреждений ДНК в целомоцитах *L. terrestris,* содержавшихся в лабораторных условиях в почве, представляющей собой смесь чистого и загрязненного мышьяком образцов в соотношении 1:1, составлял около 28% ДНК в хвосте кометы, что вдвое превышает спонтанный уровень, обнаруженный в изученных нами популяциях червей.

Наши результаты согласуются с данными, полученными и для других видов дождевых червей, обитающих в экологически чистой природной среде или содержавшихся в лабораторных условиях. Уровень спонтанных повреждений ДНК в клетках дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* и *L. rubellus*, обитающих на экологически чистых участках р. Ухты (Республика Коми), составлял соответственно 16 и 14 % ДНК в хвосте кометы [10]. У червей *E. fetida*, обитающих на экологически чистой территории горы Цзыцзинь (Китай), содержание ДНК в хвосте кометы составляло 12%, а значение хвоста Олива было равно 6 [11]. % ДНК в хвосте кометы у видов *Amynthas diffringens*, *A. caliginosa*, *Dendrodrilus rubidus*, *E. fetida* и *Microchaetus benhami,* выращенных в лабораторных условиях, составлял 18.68, 16.13, 7.57, 16.38 и 12.78, соответственно [12]. У дождевого червя *E. fetida,* выращенного в искусственной экологически чистой почве, соответствующей стандартам Международной организации по стандартизации (ISO), средние уровни % ДНК в хвосте кометы и момента хвоста Олива были равны 4 и 3.21, соответственно, при анализе частот распределений целомоцитов по степени поврежденности ДНК преобладали клетки с низким уровнем % ДНК в хвосте кометы (0-20) [13] и момента хвоста Олива (0-10) [14].

Таким образом, уровни повреждений ДНК в популяциях дождевых червей *L. terrestris* в Армении и Арцахе в основном согласуются с литературными данными. Полученные результаты позволяют считать целесо-

образным продолжение исследований популяций дождевых червей *L. terrestris* с применением метода ДНК-комет в качестве биоиндикаторов для оценки загрязнения почв генотоксикантами.

Ереванский государственный университет
e-mail: angela.sargsyan@ysu.am

А. А. Саргсян

Оценка повреждений ДНК с применением метода ДНК-комет в двух природных популяциях дождевых червей *Lumbricus terrestris*

Исследована возможность применения дождевых червей *Lumbricus terrestris* в качестве биоиндикаторов загрязнения почвы генотосикантами на территории Армении и Арцаха. Были адаптированы протоколы выделения целомоцитов и метода ДНК комет для *L. terrestris*. В популяциях червей, обитающих на относительно экологически чистых территориях сел Цахкунк (Армения) и Зуар (Арцах), уровни повреждений ДНК в целомоцитах составляют 15.41±0.55 и 14.53±0.48 % ДНК в хвосте кометы, соответственно. Полученные результаты согласуются с данными литературы об уровне повреждений ДНК у различных видов дождевых червей *L. terrestris* с применением метода ДНК-комет и в дальнейшем могут использоваться в экогенотоксикологических исследованиях для оценки загрязнения почв генотоксикантами.

Ա. Ա. Սարգսյան

ԴՆԹ-ի վնասվածության մակարդակի գնահատումը ԴՆԹ կոմետ մեթոդի կիրառմամբ *Lumbricus terrestris* անձրևորդերի երկու բնական պոպուլյացիաներում

Հետազոտվել է *Lumbricus terrestris* անձրևորդերի՝ որպես գենաթույներով հողի աղտոտվածության կենսացուցիչների կիրառման հնարավորությունը Հայաստանի և Արցախի տարածքներում։ Ադապտացվել են ցելոմի բջիջների անջատումը և ԴՆԹ կոմետ մեթոդը *L. terrestris*-ի համար։ Համեմատաբար էկոլոգիապես մաքուր տարածքներում՝ Ծաղկունք (Հայաստան) և Ջուար (Արցախ) գյուղերում, բնակվող անձրևորդերի պոպուլյացիաներում ԴՆԹ-ի վնասվածության մակարդակները կազմում են համապատասխանաբար 15.41±0.55 և 14.53±0.48 % ԴՆԹ կոմետի պոչում։ Ստացված արդյունքները համաձայնեցվում են տարբեր տեսակների անձրևորդերի ԴՆԹ-ի վնասվածության մակարդակների վերաբերյալ գրականության տվյալների հետ։ *L. terrestris*-ը ԴՆԹ կոմետ մեթոդի կիրառմամբ հետագայում կարող է օգտագործվել էկոգենաթունաբանական հետազոտություններում՝ գենաթույներով հողի աղտոտվածությունը գնահատելու համար։

A. A. Sargsyan

Evaluation of DNA Damage with Application of the Comet Assay in Two Natural Populations of *Lumbricus terrestris* Earthworms

The possibility of using *Lumbricus terrestris* earthworms as bioindicators of soil contamination by genotoxicants in the territories of Armenia and Artsakh was

investigated. The protocols of coelomocytes isolation and the comet assay were adapted for *L. terrestris*. The levels of DNA damage in coelomocytes in earthworm's populations living in pollution-free territories of Tsaghkunk (Armenia) and Zuar (Artsakh) villages were 15.41±0.55 and 14.53±0.48 % DNA in comet tail, respectively. The obtained results coincide with the literature data about levels of DNA damage in various species of earthworms. *L. terrestris* with application of the comet assay could be used in ecogenotoxicological studies for assessment of soil pollution by genotoxicants.

Литература

1. *Lanno R., Wells J., Conder J. et al.* – Ecotoxicology and Environmental Safety. 2004. V. 57. P. 39-47.
2. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidelines for testing of chemicals No. 207. Earthworm, acute toxicity test. OECD, Paris, 1984.
3. *Fitzpatrick L. C., Muratti-Ortiz J. F., Venables B. J. et al.* – Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1996. V. 57. P. 63-68.
4. *Calisi A., Lionetto M. G., Schettino T.* – Science of the Total Environment. 2011. V. 409. P. 4456-4464.
5. *Uzoka C. N., Ibe C. C., Egbuawa I. O. et al.* – International Journal of Scientific Research in Science and Technology. 2017. V. 3(7). P. 2395-6011.
6. *Osioma E., Hamilton-Amachree A.* – FUW Trends in Science & Technology Journal. 2019. V. 4. P. 319-323.
7. *Singh N. P.* – Mutat Res Rev Mutat Res. 2016. V. 767. P. 23-30.
8. *Eyambe G. S., Goven A. J., Fitzpatrick L. C. et al.* – Lab Anim. 1991. V. 25. P. 61-67.
9. *Reinecke S. A., Reinecke A. J.* – Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2004. V. 46. P. 208-215.
10. *Канева А. В., Белых Е. С., Майстренко Т. А. и др.* – Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. С. 24-34.
11. *Zheng K., Liu Z., Li Y. et al.* – Environ Sci Pollut Res Int. 2013. V. 20. P. 8382-8390.
12. *Fourie F., Reinecke S. A., Reinecke A. J.* – Ecotoxicology and Environmental Safety. 2007. V. 67. P. 361–368.
13. *Bonnard M., Eom I.-C., Morel J.-L. et al.* – Environmental and Molecular Mutagenesis. 2009. V. 50. P. 60-67.
14. *Liu Y., Zhou Q., Xie X. et al.* – Ecotoxicology. 2010. V. 19. P. 1551-1559.
15. *Klobučar G. I., Stambuk A., Srut M. et al.* – Environ Pollut. 2011. V. 159. P. 841-849.
16. *Ramadass K., Palanisami T., Smith E. et al.* – Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2016. V. 71. P. 561-571.
17. *Da Silva Júnior F. M. R., Feijo Fernandes C. L., Tavella R. A. et al.* – Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2019. V. 842. P. 111-116.
18. *Verschaeve L., Gilles J.* – Bull Environ Contam Toxicol. 1995. V. 54. P. 112-119.
19. *Button M., Jenkin G. R. T., Bowman K. J. et al.* – Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2010. V. 696. P. 95-100.
20. *Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. et al.* – Experimental Cell Research. 1988. V. 175. P.184-191.

21. *de Lapuente J., Lourenco J., Mendo S. A. et al.* – Front Genet. 2015. V. 6. P. 180.
22. *Gajski G., Žegura B., Ladeira C. et al.* – Mutat Res. 2019. V. 779. P. 82-113.
23. *Fourie F.* Evaluation of the suitability of responses on various organisational levels in terrestrial Oligochaeta to determine species sensitivity relationships. Doctoral dissertation, Stellenbosch University, South Africa. 2011, p. 176. http://scholar.sun.ac.za/bitstream/10019.1/6906/2/fourie_evaluation_2011.pdf.
24. *Diogéne J., Dufour M., Poirier G. G. et al.* – Laboratory Animals. 1997. V. 31. P. 326-336.
25. *Mincarelli L., Vischetti C., Craft J. et al.* – SpringerPlus. 2016. V. 5. P. 302-308.