

МЕЖПОПУЛЯЦИОННЫЕ РАЗЛИЧИЯ ПАРАМЕТРОВ ДНК-КОМЕТ ГЕМОЦИТОВ МОЛЛЮСКОВ *LYMNAEA STAGNALIS* ИЗ РЕГИОНОВ С РАЗНОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НАГРУЗКОЙ

© О. Ю. Конева

Институт генетики и цитологии НАН Белоруссии, Минск;
электронный адрес: koneva@tut.by

С помощью метода ДНК-комет проведены исследования гемоцитов моллюсков *Lymnaea stagnalis*, происходящих из регионов с различной экологической нагрузкой. Посредством программного анализа изображений ДНК-комет выявлены межпопуляционные различия параметров ДНК-комет гемоцитов, а также различия в чувствительности генетического материала гемоцитов моллюсков из разных экологических зон к воздействию внешних повреждающих факторов, в частности тяжелых металлов. Так как моллюски двух популяций являются генетически близкими, разный уровень активности пролиферативных процессов в гемоцитах моллюсков из разных экологических зон, выявленный нами с помощью метода ДНК-комет, может выступать индикатором интенсивности повреждающих воздействий и качества окружающей среды.

Ключевые слова: ДНК-кометы, гемоциты, популяции *Lymnaea stagnalis*, полиплоидия, политения, адаптация, биоиндикация, экологическая нагрузка.

Одной из составляющих качества жизни организма является экологическое состояние окружающей его среды. Антропогенное воздействие, сопровождающееся выбросом и накоплением генотоксических продуктов, ведет к возрастающему загрязнению окружающей среды. Для оценки повреждающего воздействия такого рода соединений на структурную организацию геномов организмов используются методы, условно разделяемые на две группы. К первой группе относятся методы, основанные на регистрации цитогенетических эффектов (хромосомных aberrаций, образования микроядер), ко второй — методы, основанные на регистрации структурных изменений молекул (наличие повреждений в молекулах ДНК, их качественный и количественный анализ) (Сирота, Кузнецова, 2010).

В 1978 г. был опубликован метод измерения повреждений ДНК в одиночных клетках, основанный на миграции ДНК в электрическом поле (Rydberg, Johanson, 1978) и усовершенствованный позднее (Ostling, Johanson, 1984). Метод ДНК-комет является высокочувствительным, позволяет оценить количество и степень генетических повреждений клеток на индивидуальном уровне и используется в качестве стандартного метода для оценки уровня повреждений (репарации) ДНК при генотоксическом тестировании и биомониторинге природных популяций (Rojas et al., 1999; Collins, 2004).

В настоящее время существуют два варианта метода ДНК-комет — нейтральной и щелочной, а также его модификации с использованием ферментов репарации ДНК. Нейтральная версия метода (Olive et al., 1991) ориентирована в основном на анализ двухнитевых разрывов ДНК, частота которых в 20—40 раз меньше, чем однони-

тевых разрывов. Щелочной вариант метода (Singh et al., 1988) позволяет выявлять более широкий спектр повреждений ДНК. В этом случае в результате введения этапа щелочной денатурации и электрофореза при $pH > 13$ возможно выявление всех видов повреждений, приводящих к разрывам цепей ДНК и их расхождению: помимо двухнитевых разрывов обнаруживаются однонитевые разрывы и щелочеллабильные сайты, реализованные в разрывы. Модификация метода со щелочной обработкой и проведением электрофореза при $pH < 12.6$ позволяет выявлять вклад только однонитевых разрывов, так как при таких значениях pH не происходит разрушения щелочеллабильных сайтов и превращения их в разрывы цепей ДНК.

Современные модификации метода ДНК-комет также позволяют обнаруживать и количественно оценивать наличие сшивок и поврежденных оснований ДНК; выявлять клетки, находящиеся в состоянии апоптоза и некроза; изучать кинетику восстановления ДНК от разрывов (Сирота, Кузнецова, 2010).

Оценку поврежденности ДНК при визуальном анализе проводят путем ранжирования «комет» по классам миграции или с использованием объект-микрометра для определения длины всей кометы или только ее хвоста. Кометы ранжируют на 5 условных типов с соответствующим для каждого типа числовым значением от 0 до 4 (Jaloszynski et al., 1997). В работах российских исследователей формула для расчета среднего индекса комет используется в измененном виде (Myazin et al., 2002). Обе формулы дают идентичные результаты.

В результате программного анализа изображений ДНК-комет получают различные параметры. Наиболее значимые из них: длина ДНК-кометы; доля ДНК, находя-

щаяся в голове кометы; доля ДНК в хвосте кометы; момент хвоста (произведение длины ДНК-кометы на долю ДНК в хвосте кометы; по: Helma, Uhl, 2000); момент хвоста (произведение расстояния между центром головы кометы и центром тяжести хвоста кометы на долю ДНК в хвосте кометы; по: Olive et al., 1990). Электрофорез одиночных клеток (или метод ДНК-комет) является простым и чувствительным методом флуоресцентной микроскопии, позволяющим обнаруживать первичные повреждения ДНК на уровне отдельных эукариотических клеток практически любой ткани организма. Возможность количественно измерить разнородность ДНК-повреждений является важным преимуществом этого метода. Быстрота исполнения, доступность и сравнительная дешевизна реактивов, малое количество биологического материала для анализа (полученного зачастую неинвазивным путем) делают метод ДНК-комет востребованным в экологических исследованиях (Сирота, Кузнецова, 2010).

Цель настоящего исследования — анализ межпопуляционных различий параметров ДНК-комет гемоцитов особей *Lymnaea stagnalis* из регионов с разной экологической нагрузкой. На основе полученных данных планировалось оценить эффективность использования метода электрофореза одиночных клеток в качестве биоиндикаторного теста, т. е. теста, позволяющего оценивать биологически значимую нагрузку на окружающую среду на основе реакции биоты (а не на основе измерений концентрации вредных веществ и т. д.), что является более адекватной оценкой. Дополнительно анализировали чувствительность гемоцитов моллюсков из регионов с разной экологической нагрузкой к повреждающему воздействию тяжелого металла стронция.

Материал и методика

Объектом исследований служили пресноводные лужные моллюски *Lymnaea stagnalis* — потомки животных из двух природных популяций: оз. Персток и затоки р. Припять Гомельской обл. Белоруссии (рис. 1). *L. stagnalis* (большой прудовик) обитает в стоячих или медленно текущих водоемах и повсеместно распространен на территории Белоруссии, что позволяет проводить широкие мониторинговые исследования популяций этих моллюсков. Следует также отметить возможность сбора гемолимфы особей неинвазивным методом (не причиняя вреда животному), что соответствует этическим нормам мировой практики работы с животными.

Популяции моллюсков обитают в регионах с различной экологической нагрузкой. Так, затока в низовьях р. Припять находится в Оревичском лесничестве Полесского государственного радиационно-экологического заповедника (ПГРЭЗ) в зоне загрязнения Чернобыльской АЭС (ЧАЭС). Она расположена на северном берегу реки между нежилыми (выселенными) деревнями Красноселье и Довляды (расстояние от ЧАЭС по прямой около 20 км) (рис. 1). Оз. Персток находится в Радинском лесничестве ПГРЭЗ вблизи нежилой деревни Масаны (расстояние до ЧАЭС по прямой около 14 км). Озеро является непроточным. Расстояние между двумя точками сбора моллюсков составляет 10.3 км (рис. 1).

Модифицированный метод электрофореза единичных клеток в нейтральных условиях (Olive et al., 1991; Лизунова, 2009) был использован для оценки различий состояния генетического материала, а также чувствитель-

ности ДНК к внешним повреждающим агентам на основе анализа гемоцитов моллюсков из различных экологических зон.

Эксперименты по оценке степени влияния на моллюсков одного из агрессивных факторов внешней среды (тяжелого металла стронция) проводили в лабораторных условиях. Использовали моллюсков первого поколения, полученных в лаборатории из кладок моллюсков популяций р. Припять и оз. Персток. На первом этапе эксперимента кладки моллюсков выдерживали в отстоянной водопроводной воде для выяснения жизнеспособности яиц. Жизнеспособность оценивали визуально, просматривая материал под бинокулярной лупой (МБС-9, СССР). Жизнеспособные яйцевые капсулы из кладок животных двух популяций выдавливали на предметное стекло, затем помещали в пробирки. Яйцевые капсулы каждой кладки разделяли на 3 группы. Группу 1 (контроль) содержали в отстоянной водопроводной воде, группы 2 и 3 — в такой же воде, но содержащей стронций ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) в концентрации, соответствующей 0.5- (группа 2) и 1-кратному (группа 3) значениям предельно допустимой концентрации (ПДК). Поскольку ПДК для атомарного стронция составляет 7 мг/л (см.: Документ Белоруссии, 2004), концентрации использованной соли стронция составляли 10.62 и 21.24 мг/л для групп 2 и 3 соответственно.

В фазе завершения эксперимента у взрослых моллюсков каждой группы (конечные группы по Sr состояли из 3—6 животных (всего 6 групп: 3 группы Припять и 3 группы Персток)) отбирали гемолимфу. Ее получали, раздражая кисточкой или иглой ногу животного. Раздражение вызывает рефлекторную защитную реакцию втягивания ноги и головы моллюска в раковину (whole-body withdrawal response). Втягивание тела моллюска в раковину сопровождается изгнанием наружу гемолимфы через гемальную пору (Sakharov, Rozsa, 1989).

Препараты ДНК-комет готовили по стандартной методике (Афонин и др., 2006). Изгоняемую наружу при втягивании тела моллюска в раковину гемолимфу собирали в пробирки. Суспензию клеток (20 мкл) гемолимфы в фосфатно-солевом буфере (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 и 2 мМ K_2HPO_4 , pH = 7.4) смешивали со 100 мкл 0.5%-ного раствора легкоплавкой агарозы (тип IV) на фосфатно-солевом буфере (pH = 7.4) при 37 °С. Смесь наносили на предметные стекла, предварительно покрытые слоем 1%-ной агарозы (со стандартной температурой плавления), накрывали покровными стеклами и выдерживали 10 мин при 4 °С до образования плотного геля. После затвердевания агарозного геля покровные стекла удаляли, а предметные стекла с гелем помещали в лизирующий буфер. Лизис иммобилизованных в агарозе клеток проводили в охлажденном (4 °С) лизирующем буфере (2.5 М NaCl, 100 мМ EDTA, 20 мМ Tris-HCl, pH 10.0, 1 % натриевой соли N-лауроилсаркозина, 1 % Triton X-100 и 10 % ДМСО) в течение 2 ч. После лизиса клеток предметные стекла переносили в охлажденный (4 °С) ТВЕ-буфер (pH = 8.0) и выдерживали 20 мин. Электрофорез проводили в ТВЕ-буфере при напряжении 1.5 В/см и температуре 4 °С в течение 30 мин. Для окраски ДНК использовали краситель акридиноновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). Изображения ДНК-комет получали, используя люминесцентный микроскоп МИКМЕД-2 вариант 11 (ЛОМО, Россия) и видеосистему на основе цифровой камеры Nikon Coolpix 4500.

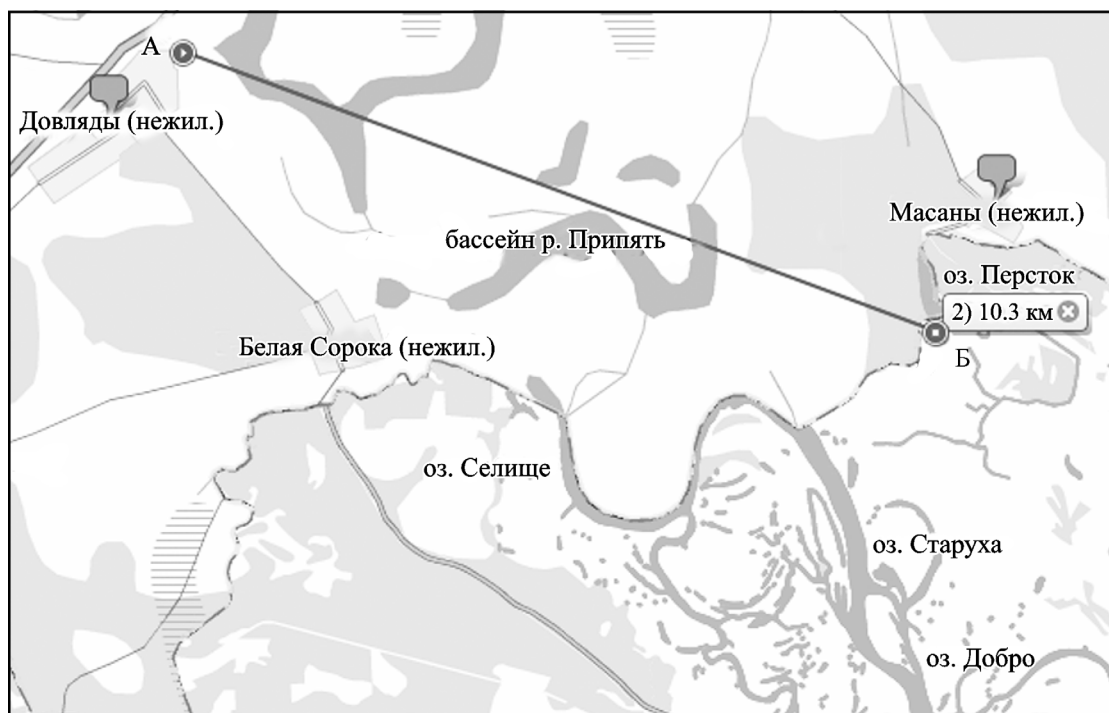


Рис. 1. Карта района исследований и мест сбора моллюсков *Lymnaea stagnalis* — затока р. Припять (А) и оз. Персток (Б). Расстояние между пунктами А и Б 10.3 км.

Изображения ДНК-комет гемоцитов от каждого моллюска анализировали, используя программу ImageJ 1.44 (Helma, Uhl, 2000). Для этого изображения обрабатывали следующим образом (рис. 2): вырезали части, пригодные для анализа (1); удаляли фоновую флуоресценцию (2); переводили в 8-битное изображение в градациях серого цвета (3); устанавливали верхние и нижние пороги, разделяющие изображение на интересные детали и фон (4); изображения разворачивали таким образом, чтобы ДНК-комета была вытянута слева направо, за-

тем производили необходимые измерения выбранных деталей. Для оценки уровня повреждений ДНК использовали следующие параметры ДНК-комет: площадь кометы (A_C) — количество пикселей, лежащих внутри выделенной зоны кометы; содержание ДНК в комете (DNA_C) — сумма значений интенсивности (яркости) пикселей кометы; содержание ДНК в голове кометы (DNA_H) — сумма значений интенсивности пикселей, лежащих внутри выделенной зоны головы кометы (область интенсивности в 100—80 % от максимума); доля

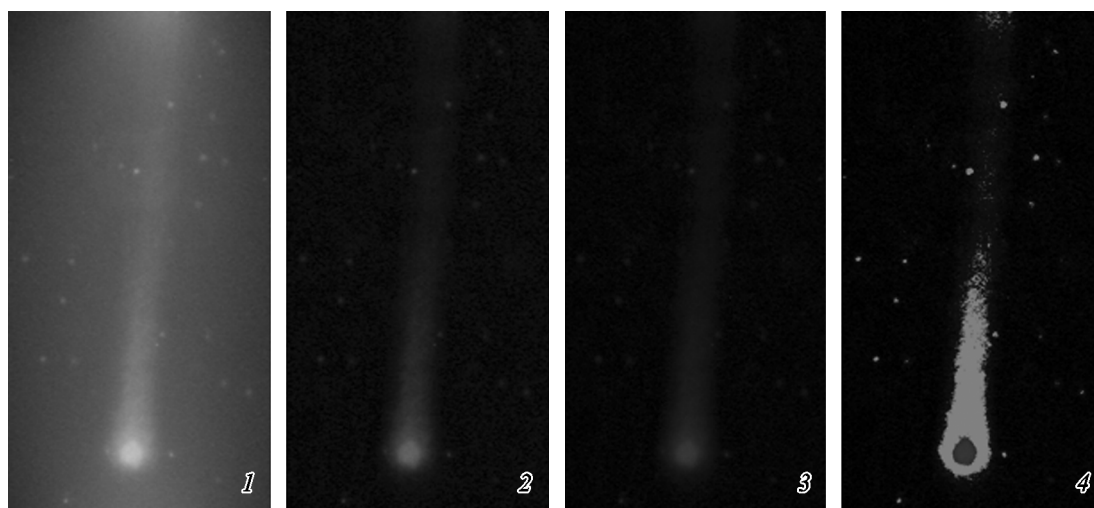


Рис. 2. Изображение ДНК-кометы гемоцита моллюска *Lymnaea stagnalis*.

1 — RGB-изображение ДНК-кометы гемоцита, полученное с помощью видеосистемы на основе цифровой камеры Nikon Coolpix 4500, об. 60×; 2 — удаление фоновой флуоресценции посредством обработки RGB-изображения в программе ImageJ 1.44; 3 — перевод RGB-изображения в 8-битное изображение в градациях серого цвета в программе ImageJ 1.44; 4 — разделение изображения ДНК-кометы на интересные детали (ядро и хвост) и фон посредством специального инструмента в программе ImageJ 1.44.

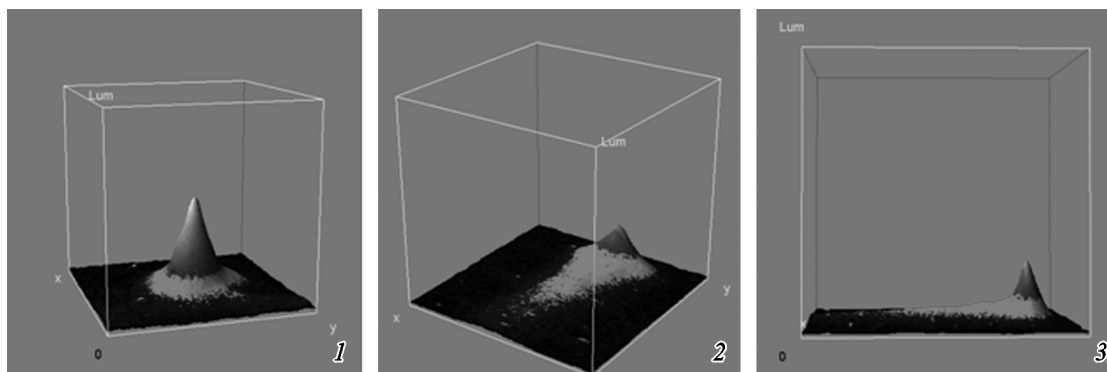


Рис. 3. Трехмерный график поверхности ДНК-кометы гемоцита с неповрежденной (1) и поврежденной (2, 3) ДНК. 1 — ДНК сосредоточена в «ядре» кометы; 2, 3 — разные ракурсы, поврежденная ДНК мигрирует в электрическом поле, образуя «хвост» ДНК-кометы. Построено на основе изображения кометы гемоцита с помощью программы ImageJ 1.44.

ДНК в хвосте кометы (% DNA_T), которую рассчитывали по формуле

$$\% DNA_T = 100 \cdot \frac{DNA_C - DNA_H}{DNA_C};$$

длина хвоста кометы (l_T) — линейное расстояние в пикселях между крайней правой точкой головы кометы и конечной точкой ДНК-миграции; диаметр головы кометы (l_H) — линейное расстояние в пикселях между крайней правой и крайней левой точками головы кометы; отношение длины хвоста к диаметру головы (l_T/l_H); разница центроидов (средние значения координаты x пикселей выделенной зоны) головы кометы и кометы в целом; момент хвоста (M_T), рассчитанный по формуле $M_T = \% DNA_T \cdot l_T$.

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 6 (StatSoft, Inc. США). В таблицах даны средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты

Во время сбора животных γ -активность моллюсков из р. Припять составила 12.7, а из оз. Персток — 585 Бк/кг. В целом концентрация обоих радионуклидов (^{137}Cs и ^{90}Sr)

у *L. stagnalis* из оз. Персток была значительно выше, чем у моллюсков из затоки р. Припять (Golubev et al., 2005; Голубев и др., 2007). Исследования препаратов ДНК-комет показали, что гемоциты моллюсков содержали как нормальные клетки (с неповрежденной ДНК), так и клетки с поврежденной ДНК (рис. 3).

Используя t -критерий Стьюдента для независимых выборок, выявили статистически высокозначимые межпопуляционные различия по всем исследуемым параметрам ДНК-комет (табл. 1, 2). Межпопуляционные различия обнаружены для гемоцитов моллюсков из контрольной группы ($P < 0.00001$) и групп моллюсков, содержащихся при 0.5- ($P < 0.04$) и 1-кратном ($P < 0.00001$) значениях ПДК. Параметры ДНК-комет гемоцитов одной особи, но из разных популяционных групп различались более чем в 2 раза (табл. 1, 2).

Программный анализ изображений показал, что площадь ДНК-комет гемоцитов моллюсков из популяции оз. Персток, а также другие параметры (суммарная интенсивность пикселей ДНК-комет, момент хвоста, отношение длины хвоста к диаметру головы кометы, длина хвоста ДНК-кометы) имеют значения в 2 раза выше, чем аналогичные параметры гемоцитов особей из популяции затоки р. Припять. Значит ли это, что гемоциты моллюсков из оз. Персток, характеризующегося высокой радиационной нагрузкой, имеют в два раза больше поврежденной ДНК? Большая длина хвоста ДНК-комет свидетельствует о наличии большого количества ДНК разрывов,

Таблица 1

Параметры ДНК-комет гемоцитов моллюсков *Lymnaea stagnalis* популяционной группы р. Припять

Значение ПДК для Sr	Число ДНК-комет	Момент хвоста (M_T)	l_T/l_H	Доля ДНК в хвосте кометы (% DNA_T)	Длина хвоста (l_T)	Разница между центроидами головы и всей кометы	Содержание ДНК в комете (DNA_C)	Площадь кометы (A_C)
0	127	24.44 ± 2.01	2.25 ± 0.10	63.55 ± 0.74	135 ± 8	37.17 ± 2.60	297 765 ± 13 823	12 292 ± 463
0.5	76	14.97 ± 1.93	1.45 ± 0.10	53.94 ± 1.18	101 ± 8	24.94 ± 2.65	251 402 ± 18 857	10 316 ± 692
1	81	12.08 ± 0.97	1.32 ± 0.07	51.89 ± 0.94	85 ± 5	21.97 ± 1.49	186 937 ± 9446	7833 ± 342
r^2 ($P < 0.05$)		-0.96	-0.92	-0.94	-0.98	-0.94	-1.00	-1.00
<u>ПДК (0)</u> ПДК (1)		2.02	1.70	1.22	1.59	1.69	1.59	1.57

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения параметров, между которыми нет статистически значимых различий ($P > 0.1$).

Таблица 2

Параметры ДНК-комет гемоцитов моллюсков *Lymnaea stagnalis* популяционной группы оз. Персток

Значение ПДК для Sr	Число ДНК-комет	M _T	I _T /I _H	%DNA _T	I _T	Разница между центроидами головы и всей кометы	DNA _C	A _C
0	102	66.72 ± 3.82 ^a	3.80 ± 0.16 ^a	74.86 ± 0.93 ^a	269 ± 12 ^a	85.21 ± 4.39 ^a	644 104 ± 28 050 ^{a, б}	25 506 ± 1000 ^{a, б}
0.5	11	53.05 ± 7.78	3.45 ± 0.33	73.24 ± 1.75	214 ± 21	71.52 ± 9.70	356 277 ± 33 372 ^a	15 721 ± 1279 ^a
1.0	65	50.00 ± 5.45 ^a	3.16 ± 0.21 ^a	68.04 ± 1.28 ^a	227 ± 17 ^a	68.06 ± 6.42 ^a	466 363 ± 41 410 ^б	18 951 ± 1440 ^б
r ² (P < 0.05)		-0.94	-1.00	-0.96	-0.73	-0.95	-0.61	-0.66
ПДК (0)		1.33	1.20	1.10	1.19	1.25	1.38	1.35
ПДК (1)								

^a P < 0.05. ^б P < 0.05.

однако увеличение площади комет и их суммарной интенсивности пикселей говорит о том, что клетки имеют больший размер и в них содержится больше ДНК.

По некоторым данным из литературы, в клетках моллюсков могут наблюдаться процессы полиплоидии и политении (Анисимов, 1998). Смысл этого цитологического феномена до конца не ясен, но существует предположение о том, что он носит адаптивный характер (Анисимов, 1986), полиплоидия (политения) может выступать универсальным механизмом интенсификации клеточных функций (Анисимов, 1998). Надежность слитной структуры для полиплоидных клеток должна означать более высокую устойчивость к повреждающим факторам. Избыточность геномных копий должна компенсировать наличие хромосомных и точечных мутаций, поддерживая работоспособность клеток в генотоксической среде и обеспечивая защиту генома от генотоксических агентов (Анисимов, 1999).

У низших беспозвоночных полиплоидия часто сопровождается экстраординарные гистогенезы у видов, осваивающих необычные среды обитания. Таким образом, в общем виде соматическую полиплоидию можно рассматривать как адаптивный морфогенетический фактор, конкретное значение которого различно и проявляется в соответствии с характером дифференциации той или иной ткани. Соматическая полиплоидия не является непременно прогрессивным свойством той или иной ткани. Она лишь обеспечивает морфофункциональные адаптации и часто бывает «выходом из положения», даже в ущерб гистогенетической пластичности, которую могут обеспечить диплоидные клеточные популяции (Анисимов, 1999). Возможность сохранения полиплоидии в качестве нейтрального признака, способного стать функционально полезным в новых условиях, отмечалась и раньше (Baglow, 1978).

Таким образом, можно предположить, что в гемоцитах моллюсков популяции оз. Персток активнее идут процессы пролиферации — полиплоидизации и(или) политенизации. Это согласуется с фактом, выявленным при цитологическом анализе: среди гемоцитов моллюсков из популяции оз. Персток чаще (в большем количестве) встречались клетки, содержащие 3 и 4 ядра (или, возможно, его сегментов), и клетки были несколько крупнее (Конева и др., 2006).

Кроме того, показаны значимые статистические различия (P < 0.05) по всем параметрам ДНК-комет между гемоцитами моллюсков из популяции р. Припять конт-

рольной группы и гемоцитами моллюсков групп 2 и 3 этой же популяции, содержащихся в присутствии стронция в концентрации, соответствующей значениям ПДК 0.5 и 1.0 соответственно. Статистически значимые различия между ДНК-кометами моллюсков групп 2 и 3 обнаружены только для следующих параметров: сумма значений интенсивностей пикселей ДНК-кометы (DNA_C), длина хвоста ДНК-кометы (I_T) и площадь кометы (A_C) (табл. 1). Корреляция всех параметров ДНК-комет с дозой была высока (см. табл. 1, коэффициент корреляции r²). Коэффициент ПДК (0)/ПДК (1) (табл. 1), оценивающий количественные различия между числовыми значениями параметров ДНК-комет в контроле и при 1-кратном значении ПДК Sr, имел высокие значения для всех параметров. Однако лучшее сочетание коэффициента корреляции r² с коэффициентом ПДК (0.5)/ПДК(1) было для показателя M_T.

Показаны значимые статистические различия (P < 0.05) всех параметров между ДНК-кометами контрольной группы моллюсков популяции оз. Персток и ДНК-кометами особей этой же популяции, которые содержались в присутствии Sr в концентрации, соответствующей значению ПДК 1 (табл. 2). Статистически значимые различия между ДНК-кометами контрольной группы и группы особей, содержащихся в присутствии меньшей дозы Sr (0.5 ПДК), показаны только для параметров DNA_C и A_C. Различия значений параметров комет между группой 2 (0.5 ПДК) и 3 (1.0 ПДК) не выявлены. Наибольший коэффициент корреляции r² с дозой обнаружен для показателей M_T, I_T/I_H, %DNA_T, разности центроидов головы кометы и всей кометы. Лучшее сочетание коэффициента корреляции r² с коэффициентом ПДК (0)/ПДК (1) было для показателя M_T (табл. 2).

Методом анализа ДНК-комет выявлено, что с увеличением дозы воздействия Sr заметно уменьшаются площадь комет, а также суммарная интенсивность пикселей комет, момент хвоста, отношение длины хвоста к диаметру головы кометы и длина хвоста кометы. Возможно, присутствие Sr снижает (блокирует) процессы пролиферации — полиплоидизации и(или) политенизации, спровоцированные (инициированные) условиями среды обитания моллюсков.

Полученные результаты позволяют утверждать, что существуют межпопуляционные различия в чувствительности генетического материала гемоцитов моллюсков к воздействию повреждающих факторов (в данном случае тяжелого металла Sr). Клетки моллюсков популяции

р. Припять более чувствительны к изменению дозы повреждающего фактора, в то время как клетки моллюсков популяции оз. Персток проявляют большую устойчивость, определенную по значениям оценочных параметров. Коэффициент ПДК (0)/ПДК (1) в популяционной группе р. Припять по отдельным параметрам достигает значения 2.02 (табл. 1). В среднем его значение по всем анализируемым параметрам составило 1.63 ± 0.24 . В популяционной группе оз. Персток среднее значение коэффициента ПДК (0)/ПДК (1) по анализируемым параметрам составило 1.26 \pm 0.10 (табл. 2). Непараметрический критерий Колмогорова—Смирнова выявил статистически значимые различия между средними значениями коэффициента ПДК(0)/ПДК(1) для популяционных групп оз. Персток и р. Припять с уровнем значимости $P < 0.025$.

Обсуждение

Хотя метод электрофореза одиночных клеток используется в основном для оценки уровня повреждений ДНК, нам с его помощью удалось выявить различия в пролиферативной активности гемоцитов в популяциях моллюсков, различающихся экологической нагрузкой на среду обитания, а также межпопуляционные различия в чувствительности генетического материала гемоцитов к воздействию повреждающих факторов.

Гемоциты моллюсков популяции оз. Персток (по сравнению с популяцией р. Припять) характеризуются более высоким содержанием ДНК. Это указывает на то, что в гемоцитах моллюсков популяции оз. Персток активнее идут процессы пролиферации — полиплоидизации и(или) политенизации.

Ранее с помощью анализа популяционной структуры на основе молекулярно-генетических маркеров нами было показано, что популяции моллюсков оз. Персток и р. Припять генетически весьма близки (Конева, 2012). Данный факт дает основание предположить, что обнаруженная в рамках проведенного исследования повышенная пролиферативная активность гемоцитов моллюсков оз. Персток может быть вызвана радиационным фактором в качестве адаптации к воздействию и не связана с наследственной изменчивостью. В свою очередь тяжелые металлы, напротив, подавляют процессы пролиферации. Уровень пролиферативных процессов в данном случае может выступать индикатором интенсивности повреждающих воздействий и индикатором качества окружающей среды.

Обнаруженные межпопуляционные различия в чувствительности генетического материала гемоцитов моллюсков к воздействию повреждающего фактора также невозможно объяснить наследственной изменчивостью, так как популяции генетически близки.

Вероятнее всего, выявленные различия вызваны эпигенетическими факторами, которые, возможно, при больших экологических нагрузках запускают механизмы адаптации, приводящие к повышению устойчивости организма животных к воздействию экстремальных факторов окружающей среды, к увеличению активности пролиферативных процессов. В литературе встречаются данные, свидетельствующие о том, что стимуляция пролиферативной активности клеток приводит к снижению повреждений ДНК; адаптивный ответ, выраженный в уменьшении чувствительности клеток к генетическим повреждениям, может сохраняться некоторое время

(даже в нескольких поколениях живых организмов) (Лизунова, 2009).

Метод ДНК-комет является эффективным инструментом для проведения мониторинговых исследований на моллюсках *L. stagnalis*. Уровень изменений в параметрах ДНК-комет гемоцитов моллюсков коррелирует с интенсивностью воздействия повреждающего агента (в частности, радиационного фактора, фактора тяжелых металлов), в связи с чем является показательным биоиндикаторным параметром. Данные сведения могут быть использованы при разработке тестов в экологическом мониторинге загрязнения поверхностных вод. На основе вышеизложенных результатов можно сделать следующее предположение. Если в ходе осуществления экологического мониторинга у особей вида-биоиндикатора *L. stagnalis* выявлены изменения пролиферативной активности по сравнению с предыдущими наблюдениями, а также снижена чувствительность к повреждающим факторам, но при этом генетическая структура наблюдаемых популяций не изменилась (ретроспективно), то следует обратить внимание на условия среды обитания. Возможно, в биотопе имеют место вредные процессы.

Комплексный подход (генетический мониторинг в сочетании с биоиндикацией) дает возможность оперативно выявлять и объективно оценивать изменения в окружающей среде на предмет отрицательных последствий для экосистемы и биоразнообразия, а также применять адекватные меры и осуществлять эффективное управление окружающей средой.

Список литературы

- Анисимов А. П. 1986. Соматическая полиплоидия в индивидуальном и историческом развитии организмов. Цитология. 28 (10) : 1125.
- Анисимов А. П. 1998. Клеточное размножение и соматическая полиплоидия в тканях брюхоногих моллюсков: обзор. I. Введение. Ткани внутренней среды. Цитология. 40 (4) : 323—331.
- Анисимов А. П. 1999. Клеточное размножение и соматическая полиплоидия в тканях брюхоногих моллюсков: обзор. VII. Соматическая полиплоидия как морфогенетический фактор. Цитология. 41 (1) : 32—39.
- Афонин В. Ю., Осипов А. Н., Воробьева Н. Ю., Голубев А. П., Конева О. Ю., Смольянова И. В. 2006. ДНК-комет-анализ клеток мантийной жидкости моллюсков *Lymnaea stagnalis* лабораторных разведений от животных, полученных из природных популяций с различных по степени загрязнения радионуклидами территорий. В кн.: Двадцать лет Чернобыльской катастрофы. Взгляд в будущее. Киев: Центр ХОЛТЕХ. 251—256.
- Голубев А. П., Сикорский В. Г., Калинин В. Н., Афонин В. Ю., Чекан Г. С. 2007. Динамика радиоактивного загрязнения экосистем разнотипных водоемов белорусского сектора зоны отчуждения Чернобыльской АЭС. Радиационная биология. Радиоэкология. 47 (3) : 322—332.
- Документ Белоруссии. 2004. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. В кн.: Сборник гигиенических нормативов по разделу коммунальной гигиены: ГН 1.1.9—23—2002 и др. Минск: Минздрав РБ. 37—92.
- Конева О. Ю. 2012. Генетическая оценка популяций моллюсков *Lymnaea stagnalis* из регионов с различной антропогенной нагрузкой как первый шаг в генетическом мониторинге. Экол. генет. 10 (2) : 20—30.

Конева О. Ю., Афонин В. Ю., Дромашко С. Е. 2006. Возрастные изменения клеточного состава мантийной жидкости и спектра цитоморфологических признаков генетических повреждений гемоцитов *Lymnaea stagnalis*. Цитология и генетика. 6 : 21—27.

Лизунова Е. Ю. 2009. Изменение радиочувствительности в поколениях облученных клеток млекопитающих: Автореф. канд. дис. М.: Ин-т хим. физ. РАН. 20 с.

Сирота Н. П., Кузнецова Е. А. 2010. Применение метода «Комета тест» в радиобиологических исследованиях. Радиационная биология. Радиэкология. 50 (3) : 329—339.

Barlow P. W. 1978. Endopolyploidy: towards an understanding of its biological significance. Acta biotheoretica. 27 : 1—18.

Collins A. R. 2004. The Comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol. 26 : 249—261.

Golubev A. P., Aфонin V., Maksimova S., Androsov V. 2005. The current state of pond snail *Lymnaea stagnalis* populations from water reservoirs of the Chernobyl nuclear accident zone. Radioprotection. 40 : S511—S517.

Helma C., Uhl M. 2000. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. Mut. Res. 466 : 9—15.

Jaloszynski P., Kujawski M., Czub-Swierczek M., Markowska J., Szyflier K. 1997. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. Mut. Res. 385 : 223—233.

Myazin A. E., Osipov A. N., Elakov A. L., Sypin V. D., Shevchenko V. A. 2002. Estimation of single-strand DNA breaks in spleen lymphocytes at late term after acute irradiation of mice at sublethal and median lethal doses by comet assay. Радиационная биология. Радиэкология. 42 (6) : 731—734.

Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E. 1990. DNA heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. Radiat. Res. 122 : 86—94.

Olive P. L., Wlodek D., Banath J. P. 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cell subjected to gel electrophoresis. Cancer Res. 51 : 4671—4676.

Ostling O., Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123 : 291—298.

Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis: methodology and applications. J. Chromatog. B. 722 : 225—254.

Rydberg B., Johanson K. J. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. New York: Acad. Press. 465—468.

Sakharov D. A., Rozsa K. S. 1989. Defensive behaviour in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: the whole body withdrawal associated with exsanguinations. Acta Biol. Hung. 40 : 329—341.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175 : 184—191.

Поступила 7 VIII 2012

INTERPOPULATION DIFFERENCES IN PARAMETERS OF HEMOCYTE DNA-COMETES OF SNAIL *LYMNAEA STAGNALIS* FROM REGIONS WITH THE DIFFERENT ENVIRONMENTAL LOAD

A. Yu. Koneva

Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus, Minsk;
e-mail: koneva@tut.by

The research of hemocytes of snail *Lymnaea stagnalis* from regions with different environmental load has been carried out by means of DNA-comet assay. Significant interpopulation distinctions in parameters of hemocytes DNA comets, and also significant differences of sensitivity of hemocyte genetic material in snails from different ecological zones to the influence of external damaging factors (in particular, heavy metals) have been revealed by means of the software analysis of hemocyte DNA-comet images. Since the two populations of mollusks are characterized by high genetic identity, the different levels of proliferative processes in hemocytes of snail *Lymnaea stagnalis* from different ecological zones (that we revealed using the comet assay) may act as an indicator of the intensity of damaging effects and environmental quality.

Key words: DNA-comet, hemocyte, *Lymnaea stagnalis* populations, polyploidy, polyteny, adaptation, bioindication, environmental load.