

0-796293

На правах рукописи

В. С.

СЛОБОДСКОВА ВАЛЕНТИНА ВЛАДИМИРОВНА

**ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ
НА МОРСКИХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ**

03.02.08 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2012

Работа выполнена в лаборатории морской экотоксикологии ФГБУН «Тихоокеанского океанологического института им. В. И. Ильичева» ДВО РАН

Научный руководитель:

Челомин Виктор Павлович
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Костецкий Эдуард Яковлевич
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биохимии, микробиологии
и биотехнологии Школы естественных наук
ФГАОУ ВПО «Дальневосточный
федеральный университет»

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



0000791158

Ирейкина Светлана Александровна
кандидат биологических наук,
научный сотрудник лаборатории комплексных
исследований ресурсов рыб Японского моря
ФГУП «Тихоокеанский научно
-исследовательский рыбохозяйственный
центр» (ТИНРО-центр)

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства» ФГУП «АЗНИИРХ»

Защита состоится «15» июня 2012г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.056.02 при ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет» по адресу: 690091, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27, ауд. 435

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 690091, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27, комната 417, кафедра экологии ШЕН ДВФУ. Факс (423) 245-94-09 E-mail: marineecology@rambler.ru

**С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»
Автореферат разослан «15» мая 2012г**

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук**

Ю.А. Гальшева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Активная хозяйственная деятельность человека приводит к поступлению в прибрежную зону химических соединений различного происхождения, включая такие опасные вещества, как тяжелые металлы, пестициды и нефтеуглеводороды. Обитатели прибрежных морских акваторий, особенно вблизи урбанизированных территорий, уже сейчас испытывают воздействие повышенных концентраций Cd. Это влияние нередко проявляется в виде постепенного накопления металла в тканях различных организмов и его миграции по пищевым цепям, что представляет серьезную угрозу для жизнедеятельности гидробионтов и здоровья человека (Шулькин, 2004).

Кроме того, для водных масс прибрежных районов характерны резкие изменения многих абиотических факторов – температуры, солености, и особенно концентрации кислорода и других, которые оказывают существенное влияние на жизнедеятельность обитающих здесь живых организмов. Известно, что зоны гипоксии, образующиеся в различных акваториях шельфа Мирового океана, приводят к гибели отдельных видов гидробионтов и трансформации экосистем (Wu, 2002). В свою очередь, вариабельность абиотических факторов может изменять биодоступность и, соответственно, токсичность загрязняющих веществ. Поэтому в зонах с нестабильной экологической обстановкой возникает множество синергических и антагонистических комбинаций, маскирующих эффекты антропогенных факторов. При этом использование традиционных гидробиологических методов оценки негативных изменений в экосистемах не позволяет оперативно оценить экотоксикологическую ситуацию в акваториях.

В связи с этим представляется целесообразным применение подходов, основанных на анализе отдельных ключевых биохимических параметров (молекулярных биомаркеров), отражающих общее изменение физиологического состояния организма в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды (Строганов, 1962,1973; Панин, 1983; Остроумов, 1986; Сидоров, 1987; Лукьянова, 2001). Основное преимущество использования неспецифических молекулярных маркеров заключается не только в высокой чувствительности, точности и экспрессности определения, но и в установлении причинно-следственных связей при взаимодействии организма и среды, что открывает возможность предсказывать изменения в популяциях и сообществах в загрязненных районах. Оценка опасности развития отдаленных эффектов может быть более эффективной, если основывается на данных о генотоксичности поллютантов (Depledge, 1998). Учитывая исключительную роль генома в функционировании биологических систем, выявление повреждений в структуре молекулы ДНК следует отнести к наиболее важным проявлениям токсичности. В последние годы было разработано много методов, позволяющих регистрировать повреждения ДНК, а также исследовать процессы репарации. Наибольший интерес представляют показатели, характеризующие уровень повреждения ДНК, который выявляется в настоящее время с помощью метода ДНК-комет.

Цель исследования:

Выявить степень повреждения ДНК двусторчатых моллюсков, испытывающих воздействие негативных факторов окружающей среды.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. В экспериментальных условиях оценить генотоксичность кадмия на клетки жабр двусторчатых моллюсков с помощью метода ДНК-комет;
2. Выявить влияние дефицита кислорода на целостность ДНК клеток жабр двусторчатых моллюсков;
3. На основе кометного анализа провести оценку физиологического состояния двусторчатых моллюсков из ряда прибрежных акваторий.

Научная новизна

Впервые проведена генотоксическая оценка прибрежных акваторий залива Петра Великого с использованием метода ДНК-комет. Установлено, что дефицит кислорода в окружающей среде сопровождается накоплением повреждений в структуре молекулы ДНК. Выявлено, что у моллюсков, обитающих в акваториях с высокой антропогенной нагрузкой, деструктивным изменениям подвержена более чем 1/3 часть генома жаберных клеток.

Практическая значимость

Результаты работы могут быть использованы при проведении мониторинга воздействия загрязнения на морские организмы и прогноза устойчивости прибрежных экосистем при антропогенной трансформации водных объектов. Метод ДНК-комет может быть применен в аквакультуре для оценки физиологического состояния гидробионтов.

Защищаемые положения

1. Естественные (дефицит кислорода) и техногенные (кадмий [Cd]) факторы среды инициируют деструктивные изменения в геноме двустворчатых моллюсков.
2. Метод ДНК-комет является перспективным чувствительным подходом в экодиагностике, направленным на изучение состояния водной среды и выявление патологических изменений в прибрежных экосистемах.

Апробация работы

Результаты и основные положения диссертации были представлены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях: PICES Seventeen Annual Meeting/Beyond observations to achieving understanding and forecasting in a changing North Pacific: Forward to the FUTURE (Dalan, China 2008); «Исследования мирового океана» (Владивосток, 2008); «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии» (Владивосток, 2008); «Геология, география и экология океана» (Ростов-на-Дону, 2009); 17th International Pectinid Workshop (Santiago de Compostela, Spain, 2009); «Океанологические исследования» (Владивосток, 2009); Современные проблемы геологии, геохимии и геоэкологии Дальнего Востока России» (Владивосток, 2010); «Проблемы экологии морского шельфа» (Владивосток, 2010); «Современные проблемы гидроэкологии» (Санкт-Петербург, 2010); «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2010); PICES/North Pacific Ecosystems Today, and Challenges in Understanding and Forecasting Change (Portland, OR, U.S.A., 2010); «Чтения памяти В. Я. Леванидова» (Владивосток, 2011); «Океанологические исследования» (Владивосток, 2011); «Проблемы экологии морского шельфа» (Владивосток, 2011).

Публикации

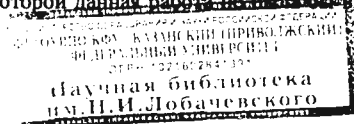
По теме диссертации опубликованы 18 научных работ, из них 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 129 страницах, включает 14 таблиц и 36 рисунков, состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы. Список литературы включает 190 источников, из которых 121 иностранный.

Благодарности

Выражаю благодарность научному руководителю д.б.н., старшему научному сотруднику ТОИ ДВО РАН В.П. Челомину за помощь на всех этапах планирования и выполнения работы и анализа полученных результатов. Автор благодарит научного сотрудника ТОИ ДВО РАН Е.Е. Солодову, без участия которой данная работа не была бы выполнена. Вы-



ражаю благодарность научному сотруднику ИБМ ДВО РАН О. В. Подгурской за ценные замечания и советы при обсуждении и анализе материалов работы. Признательна Е.С. Слободскову за помощь в сборе материала, а также всему коллективу лаборатории морской экотоксикологии ТОИ ДВО РАН за постоянную моральную поддержку и внимание, конструктивные замечания и советы в процессе исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 11.G34.31.0010.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Представлена краткая характеристика современной экологической ситуации в прибрежной зоне Мирового океана и состояния отдельных морских акваторий. Подробно освещена проблема антропогенного загрязнения и его негативного последствия на состоянии гидробионтов. Выделены основные типы загрязняющих гидросферу веществ, а также описан механизм их токсического действия на организмы. Рассмотрены современные методы контроля и оценки качества морской среды в биомониторинге. Подробно проанализирован метод ДНК-комет как интегральный и ранний предупреждающий сигнал опасности развития деструктивных процессов на высших уровнях организации живых систем. Обсуждена роль влияния окислительного стресса в развитии поврежденных молекулы ДНК.

Глава 2. Район работ. Материалы и методы исследования

В основу работы положены результаты, полученные автором с 2008 по 2011 г.

В главе дана краткая физико-географическая характеристика зал. Петра Великого. В работе использовались наиболее массовые, широко распространенные в зал. Петра Великого представители обширной группы двусторчатых моллюсков (*Crenomytilus grayanus*, *Modiolus kurilensis*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Corbicula japonica*). Данную группу беспозвоночных объединяют некоторые общие черты физиолого-биохимической организации, но существенно отличает приуроченность к разным биотопам. Мидия может выносить сильное опреснение. По способу обитания – эпибионт, т. е. обитает на поверхности дна (как правило, скального грунта), прикрепляется к субстратам биссусом. Модиюлус встречается на илистых и песчано-алевроитовых отложениях, среди которых рассеяны валуны и крупные гальки. Прикрепляется с помощью многочисленных нитей биссуса к валунам и галькам, образуя сростки – друзы. Гребешок является стенооксифильным видом, способным к перемещению. Обитает на илисто-песчаном или песчаном грунтах, требователен к кислороду и чистоте вод. Корбикула – широко распространенный эвригалинный вид. Диапазон приемлемой солености от 0 до 10 ‰. Встречается на илистых, илисто-песчаных и песчаных грунтах, зарываясь в них. Обитает преимущественно в устьевых зонах рек.

Моллюски были собраны водолажным способом в различаются по антропогенной нагрузке акваториях залива Петра Великого (рис. 1).

Известно, что наибольшую антропогенную нагрузку имеют акватории эстуария р. Раздольная, примыкающей к нему лагуны Тихой, а также прибрежная зона г. Владивосток (м. Кунгасный) (Огородникова, 2001; Наумов, 2003; Нигматулина, 2008). В районах эстуариев рек Артемовка и Партизанская характерен спад производства, что в значительной мере снижает негативное воздействие на водные экосистемы. Лагуна Лебяжья, бухты Северная, Восточная и Алексеева максимально удалены от влияния бытовых и промышленных стоков. Однако известно, что в бух. Алексеева существуют природные источники загрязнения – ртутные аномалии, обнаруженные на ее акватории (Лучшева, 1995).

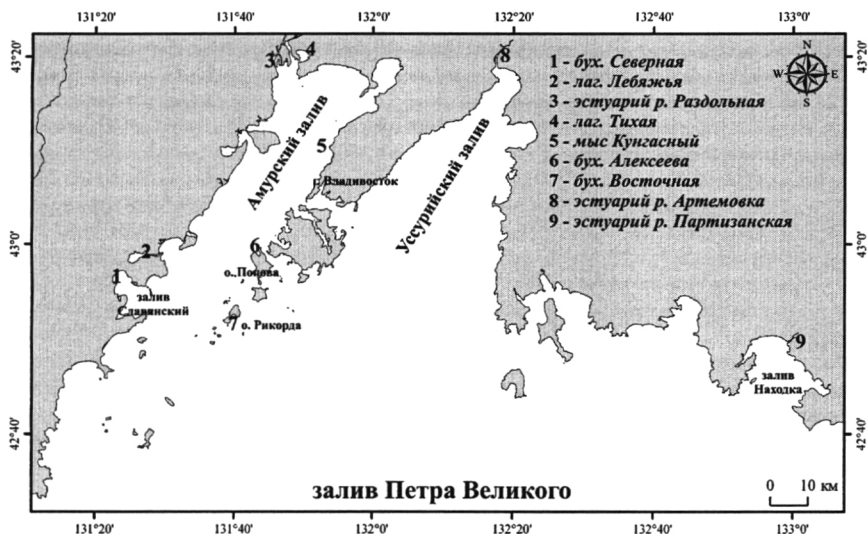


Рис. 1. Карта-схема района сбора материала в зал. Петра Великого (Японское море)

Для изучения генотоксичности кадмия и влияния дефицита кислорода на ДНК клеток жабр двустворчатых моллюсков был проведен ряд аквариумных экспериментов: 1) действие кадмия (Cd) на три вида моллюсков: *M. yessoensis*, *M. kurilensis*, *C. japonica*, собранных в относительно чистых местах. Нагрузка Cd – 300 мкг/л (CdCl_2) в течение 4-х сут., с ежедневной сменой воды; 2) аноксия и реоксигенация – на примере *M. yessoensis*. Экспериментальную аноксию создавали, выдерживая гребешков на воздухе при температуре 11°C в течение 8 ч., с последующей реоксигенацией в течение 12 ч. В эксперименте использовали гребешков, отобранных из садков марикультурного хозяйства, расположенного в бух. Северной (Славянский залив). Влияние аноксии на целостность молекулы ДНК в естественных условиях изучали на примере моллюсков корбикул, отобранных в 2-х районах эстуария реки Артемовки: 1) в полноводной части и 2) на обнажающейся во время отливов отмели.

Для оценки качества среды в прибрежной зоне зал. Петра Великого на основе генотоксичности были использованы моллюски *C. grayanus*, *M. yessoensis*, *C. japonica* из акваторий, отличающихся друг от друга степенью антропогенной нагрузки. Отбор животных выполняли: 1) корбикула - в весеннее время, в мае; 2) гребешок и мидия были получены в осеннее время, в октябре – ноябре.

Для биохимических анализов использованы жабры, как основной орган контакта со средой, через который происходит поступление токсикантов в организм гидробионтов.

Степень развития окислительного стресса оценивали по изменению концентрации малонового диальдегида (МДА) как конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Buege and Aust, 1978). Концентрацию МДА определяли на следующий день после препарирования. Хранили материал при -80°C . Приготовление гомогената проводилось на льду. Для количественного анализа содержания тяжелых металлов в тканях моллюсков был применен атомно-абсорбционный метод (Julshamn, Andersen, 1983). Из всех экспериментальных групп отбирали по 15 экз. моллюсков для определения уровня содержания ПОЛ и тяжелых металлов в 4-х параллельных пробах.

При определении количества повреждений в молекуле ДНК использовали щелочной вариант кометного анализа (Singh et al., 1988), адаптированного к морским организмам (Mitchelmore et al., 1998). В основе метода лежит опосредованная воздействием постоянного электрического поля миграция ДНК единичных клеток в агарозном геле. Наблюдаемый при этом во флуоресцентном микроскопе геном индивидуальной клетки представлен в виде электрофоретического следа, или так называемой «кометы». Критериями оценки степени фрагментации ДНК в клетке являются длина хвоста кометы и доля мигрировавшей ДНК (Тронов, Пелевина, 1996). Метод включает в себя следующие этапы: приготовление гель-слайда, лизис клеток, щелочную инкубацию, электрофорез, нейтрализацию, окраску слайдов, анализ и обработку данных.

Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Для обработки цифровых изображений была использована компьютерная программа CometScore Freeware v1.5, которая позволяет вычислять различные параметры комет, указывающие на степень повреждения клеточной ДНК. В работе определяли в каждой комете два параметра: долю ДНК в хвосте кометы и длину хвоста кометы. Для визуальной классификации комет применялся метод, предложенный А. Коллинзом с коллегами (Collins et al., 1995). Данный подход предполагает деление комет на 5 классов (C0, C1, C2, C3, C4) по степени фрагментации молекулы ДНК. Исходя из количества комет, принадлежащих к каждому классу, рассчитывали индекс генетического повреждения (ИГП) $(C1+2*C2+3*C3+4*C4)/(C0+C1+C2+C3+C4)$ (Cavas, 2008). Во всех исследованных группах моллюсков анализировали по 15 слайдов (1 слайд = 1 особь), содержащих не менее 50 комет в каждом.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2003. Оценку результатов проводили по каждому эксперименту путем сравнения среднегрупповых показателей ($P < 0,05$ с использованием непараметрического критерия Даннета).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Оценка генотоксичности тяжелых металлов (на примере кадмия) в клетках жабр различных видов двустворчатых моллюсков

За время пребывания в одинаковых экспериментальных условиях (300 мкг Cd/л, 4 сут.) в жабрах разных видов двустворчатых моллюсков были отмечены существенные различия в скорости аккумуляции кадмия и образовании повреждений молекулы ДНК (рис.1).

В связи с тем, что максимальная скорость накопления кадмия и образования повреждений в ДНК наблюдается в жабрах *S. japonica*, то корбикулу можно отнести к наиболее эффективному аккумулятору этого металла (рис. 1). Следует отметить, что на 4–е сут. содержание кадмия в жабрах этого моллюска увеличилось практически в 35 раз по сравнению с контролем. По истечению опыта у гребешка отмечено увеличение содержания кадмия в 13 раз в сравнении с контролем, у модиолуса в – 6 раз. Это объясняется различной эффективностью межтканевого переноса этого металла для каждого вида моллюсков (табл. 1). Известно, что у модиолуса и гребешка, в отличие от корбикулы, этот механизм достаточно хорошо развит (Челомина, 1998; Подгурская 2005).

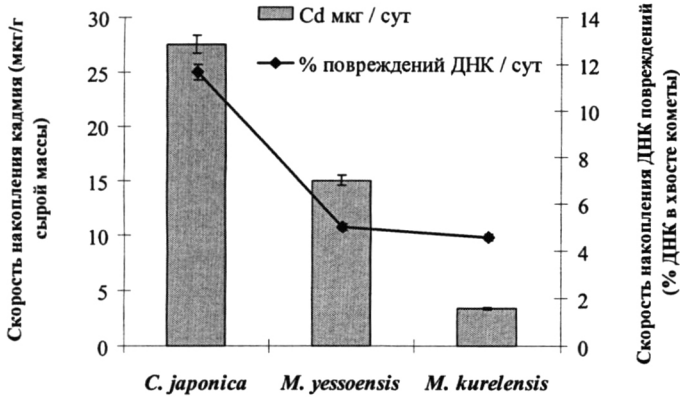


Рис. 1. Скорость накопления Cd и повреждений ДНК в клетках жабр двустворчатых моллюсков ($n = 15$, $P < 0,05$)

Таблица 1. Концентрация кадмия (мкг / г сырой массы) в органах моллюсков (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 15$)

Вид моллюсков/ условия эксперимента	Жабры (Ж)	Пищеварительная железа (ПЖ)	Отношение Ж / ПЖ	
<i>C. japonica</i>	К	$3,10 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,05$	1,8
	Э	$113,0 \pm 15,0^*$	$38,6 \pm 3,2^*$	2,9
<i>M. yessoensis</i>	К	$5,1 \pm 1,1$	$60,5 \pm 4,5$	0,1
	Э	$65,6 \pm 5,2^*$	$238 \pm 23,1^*$	0,3
<i>M. kurilensis</i>	К	$8,0 \pm 1,9$	$3,9 \pm 0,6$	2,1
	Э	$15,7 \pm 2,6^*$	$38,0 \pm 3,5^*$	0,4

Примечание: * – достоверное отличие ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

Важно подчеркнуть, что существенное накопление кадмия в клетках моллюсков стало причиной нарушения стационарности процессов свободнорадикального окисления. В процессе аккумуляции Cd в тканях моллюсков шло образование продуктов окислительной деструкции липидов (МДА). В жабрах моллюсков, имеющих больший процент повреждения ДНК (*C. japonica* и *M. yessoensis*), определяли содержание МДА. Так, например, у гребешка к концу эксперимента содержание МДА увеличилось, по сравнению с исходным более чем в 4 раза, у корбикулы японской – более чем в 1,5 раза.

При анализе полученных ДНК-комет видно, что молекула ДНК клеток жабр контрольных моллюсков разных видов образует симметричное яркое ядро (рис. 2а, 3а, 4а) (полость в агарозе, заполненную ДНК) и окружающее его «гало», представленное вышедшими в агарозу петлями высокополимерной ДНК. В то же время у моллюсков, выдержанных в растворе кадмия, молекула ДНК образует хорошо выраженные кометы, что очевидно, обусловлено глубокой деградацией генома и миграцией низкополимерных фрагментов ДНК (рис. 2б, 3б, 4б). Исходя из классификации, предложенной А. Коллинзом с коллегами (Collins et al., 1995), клетки жабр контрольных моллюсков образуют кометы, которые можно отнести к двум классам: С0 и С1.

При воздействии кадмия у моллюсков формируются кометы, относящиеся преимущественно к классу С3 и С4, что свидетельствует о высоком уровне фрагментации молекулы ДНК (рис. 5).

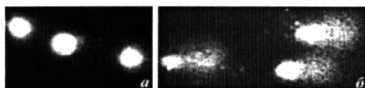


Рис. 2. Микрофотографии комет, формируемые клетками жабр контрольных (а) и экспериментальных (б) моллюсков корбикул

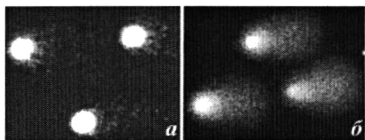


Рис. 3. Микрофотографии комет, формируемые клетками жабр контрольных (а) и экспериментальных (б) моллюсков приморских гребешков

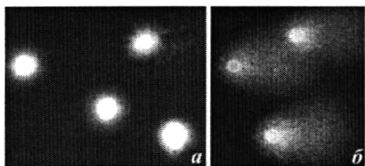


Рис. 4. Микрофотографии комет, формируемые клетками жабр контрольных (а) и экспериментальных (б) моллюсков модиолусов

Следует отметить, что у экспериментальной группы индекс генетического повреждения (ИГП) значительно выше, чем у контрольной группы (рис. 6), тогда как считается, что в норме значение ИГП находится в пределах единицы (Cavas, 2008).

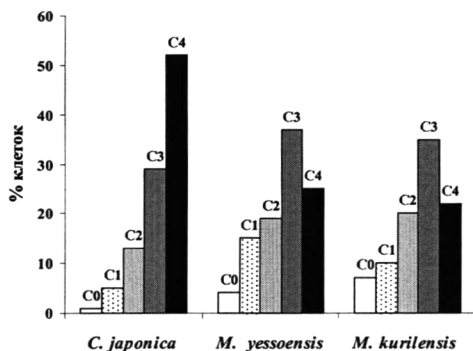


Рис. 5. Относительное содержание классов комет в клетках жабр экспериментальных моллюсков (n = 750)

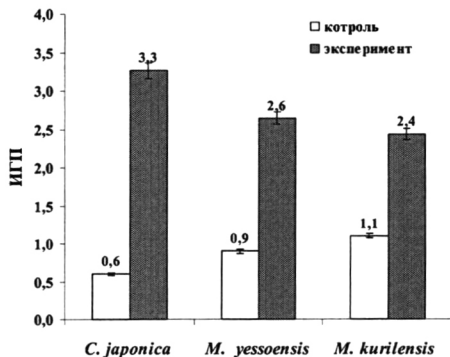


Рис. 6. Индекс генетического повреждения (ИГП) ДНК жабр различных видов моллюсков при аккумуляции кадмия (n = 15)

Наряду с визуальной классификацией комет был применен компьютерный анализ выборки; рассчитывали долю ДНК в хвосте кометы и длину хвоста кометы (табл. 2). В клетках жабр экспериментальной группы значения этих параметров гораздо выше, чем в контрольной группе моллюсков (табл. 2).

Таблица 2. Основные параметры ДНК-комет клеток жабр двустворчатых моллюсков из контрольной и экспериментальной групп (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 15$)

Моллюск	% ДНК в хвосте комет		Длина хвоста комет	
	контроль	эксперимент	контроль	эксперимент
<i>C. japonica</i>	2,4 \pm 2,0	49,0 \pm 15,5*	5,00 \pm 3,8	93,5 \pm 35,0*
<i>M. yessoensis</i>	11,35 \pm 3,48	32,83 \pm 6,60*	7,54 \pm 3,48	40,74 \pm 10,17*
<i>M. kurilensis</i>	14,20 \pm 5,32	32,7 \pm 9,79*	21,37 \pm 6,97	58,88 \pm 14,59*

Примечание: * – достоверное отличие ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

Таким образом, кадмий проявляет генотоксические свойства, вызывая резкое увеличение повреждений молекулы ДНК, его воздействие сопровождается накоплением продуктов перекисного окисления липидов (МДА) в жабрах моллюсков.

Глава 4. Влияние дефицита кислорода на целостность ДНК клеток жабр двустворчатых моллюсков

4.1. Деструкция ДНК клеток жабр двустворчатого моллюска *Corbicula japonica*, обитающего в приливно-отливной зоне

Для исследований моллюски были отобраны в 2-х разных районах эстуария реки Артемовки: первый находится в полноводной части реки, второй – на обнажающейся во время отливов отмели.

После электрофореза молекулы ДНК клеток жабр корбикулы, собранной в 1-м районе, не имели значительных повреждений. Данные кометы можно отнести к двум классам: С0 и С1. В то же время у моллюсков, отобранных в приливно-отливной зоне, наблюдались кометы, принадлежащие преимущественно к классам С2 и С3, что свидетельствует о более глубоком уровне фрагментации молекулы ДНК (рис. 7).

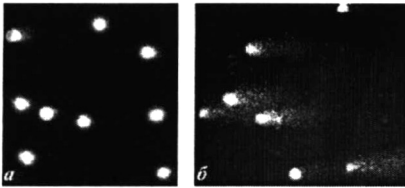


Рис. 7. Микрофотографии комет, формируемые клетками жабр *C. japonica* собранных в эстуарии р. Артемовка: (а) полноводная часть реки; (б) обнажающаяся отмель

При дефиците кислорода в среде обитания у корбикул были выявлены деструктивные изменения генома жаберных клеток, а также накопление МДА (табл. 3).

Таблица 3. Основные параметры ДНК-комет клеток жабр и концентрация МДА в жаберной ткани моллюсков *C. japonica*, собранных в разных районах эстуария р. Артемовка (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 15$)

Места сбора моллюсков	Длина «хвоста» комет	% ДНК в «хвосте» комет	МДА (нмоль/г сырой ткани)
Район 1	5,00 \pm 3,8	4,33 \pm 2,1	3,46 \pm 0,59
Район 2	48,68 \pm 13,2*	31,88 \pm 10,20*	14,22 \pm 1,28*

Примечание: * – достоверное отличие ($P \leq 0,05$) по сравнению с районом 1.

Таким образом, моллюски, обитающие в приливно-отливной зоне (обнажающаяся отмель), находятся в неблагоприятных условиях существования, так как практически 1/3 ДНК клеток жабр корбикул была повреждена (табл. 3). Для моллюсков из района 2 характерно значительное увеличение содержания МДА – более чем в 4 раза, по сравнению с обитателями в районе 1. У животных, находящихся в более стабильных условиях, отмечено отсутствие ДНК-разрывов или слабое их проявление. Известно, что массовые скопления *S. japonica* в зал. Петра Великого формируются на глубине от 1 до 3 м., а обитание на литорали не является характерным для моллюска (Явнов, 2002). Это указывает на их чувствительность к дефициту кислорода. Таким образом, недостаток кислорода в среде оказывает отрицательное воздействие на корбикул, которое проявляется в нарушении целостности молекулы ДНК. Подобная ответная реакция организма, в свою очередь, ведет к мутациям и злокачественным перерождениям (Bjelland, 2003).

4.2. Влияние аноксии и последующей реоксигенации на целостность ДНК клеток жабр *Mizuhopecten yessoensis*

Под влиянием аноксии в жабрах моллюсков происходило накопление поврежденных молекулы ДНК. На полученных изображениях электрофоретических следов ДНК (рис. 8) после 8 - часовой аноксии видны явные патологические изменения в структуре молекулы ДНК (в отличие от контрольной группы). После 12 - часовой реоксигенации ДНК жабр гребешка приморского достаточно хорошо восстановилась, при этом параметры ДНК комет у контрольных моллюсков и группы после реоксигенации практически не отличались (табл. 4). Количество поврежденных молекулы ДНК при аноксии увеличилось в сравнении с контролем почти в 2,5 раза и уменьшилось после реоксигенации почти в 2 раза.

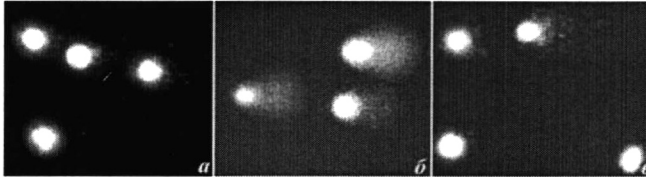


Рис. 8. Микрофотографии комет, формируемые клетками жабр *M. yessoensis*: (а) контроль; (б) аноксия; (в) реоксигенация

Таблица 4. Основные параметры ДНК-комет клеток жабр *M. yessoensis* под действием аноксии и реоксигенации (среднее \pm стандартное отклонение, n = 15)

Группа	Показатель	Повреждение ДНК	
		Длина хвоста кометы (рх)	% ДНК в хвосте кометы
Контроль		7,54 \pm 2,5	11,35 \pm 3,48
Аноксия		19,25 \pm 5,45*	25,93 \pm 5,24*
Реоксигенация		11,65 \pm 1,69*	13,19 \pm 2,29*

Примечание: * – достоверное отличие ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

В контрольной группе гребешков в большинстве клеток жабр были обнаружены незначительные изменения ДНК (не более 11 %). Значительное увеличение количества поврежденных ДНК отмечено у моллюсков, подвергшихся действию аноксии (8 ч.) и составило 20-30% для основной выборки клеток. Необходимо отметить, что после пребывания моллюсков в нормальных условиях (реоксигенация 12 ч.), структура ДНК восстановилась практически до контрольного уровня (рис. 9).

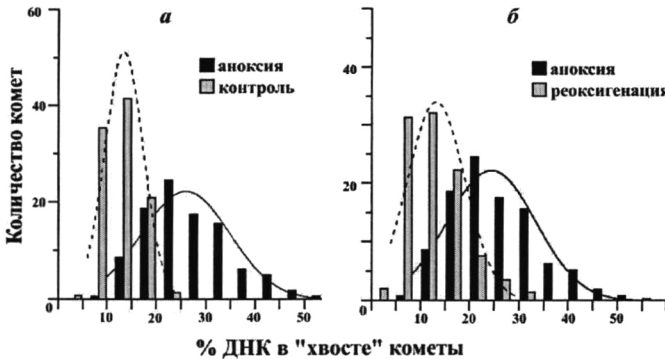


Рис. 9. Количественное распределение комет по степени поврежденности: (а) – контроль и аноксия; (б) – аноксия и реоксигенация (n = 750)

Таким образом, дефицит кислорода в среде действительно является одним из важнейших абиотических факторов для морских организмов. Низкие концентрации кислорода вызывают деструктивные изменения в молекуле ДНК, которые, накапливаясь, ведут к нестабильности генома. Важно подчеркнуть, что генотоксичность аноксии зависит от времени отсутствия кислорода в среде. При этом, если не нарушается баланс между уровнем повреждения ДНК и эффективностью системы репарации ДНК, необратимых токсических эффектов не появится.

Глава 5. Оценка качества вод прибрежной зоны зал. Петра Великого на основе генотоксичности

5.1. *Mizuhopecten yessoensis*

Отмечены значительные повреждения ДНК цепи у моллюсков, собранных из района с выраженной антропогенной нагрузкой (м. Кунгасный), полученные кометы можно отнести к классам С3 и С4 как наиболее поврежденные. У животных, полученных из незагрязненных участков (бух. Восточная), в том числе и из хозяйства марикультуры (бух. Северная), отмечено отсутствие ДНК-разрывов или слабое их проявление, что говорит о принадлежности таких клеток к классам С0/С1 (рис. 10).



Рис. 10. Микрофотографии комет, формируемые клетками жабр *M. yessoensis*: (а) бух. Восточная; (б) бух. Северная; (в) м. Кунгасный

Максимальное значение индекса генетического повреждения (ИГП) наблюдалось у моллюсков из акватории, прилегающей к Владивостоку. У гребешков из бухт Северной и Восточной этот показатель ниже почти в 2,2 и 2,9 раза соответственно (табл. 5).

Усредненные параметры полученных комет (доля ДНК в «хвосте» кометы, длина «хвоста» кометы), отражающие степень повреждения ДНК клеток жабр моллюска приведены в табл. 6. Необходимо отметить, что доля ДНК, мигрирующей из ядра кометы, в клетках моллюсков, из бух. Северная и бух. Восточная, не превышала 13%, тогда как в клетках моллюсков, отобранных из окрестностей м. Кунгасного, этот показатель для основной массы комет составлял 40–45%. Длина хвоста комет, образуемых клетками жабр моллюсков, подверженных негативному влиянию, также значительно увеличивается.

Таблица 5. Основные параметры ДНК-комет клеток жабр *M. yessoensis*, собранных в разных районах зал. Петра Великого (среднее \pm стандартное отклонение, n = 15)

Район Показатель	Повреждение ДНК		
	Длина «хвоста» кометы (рх)	% ДНК в «хвосте» кометы	Индекс генетического повреждения (ИГП)
Бух. Восточная	7,54 \pm 2,71	11,35 \pm 3,48	0,9
Бух. Северная	11,94 \pm 5,74*	12,09 \pm 6,79*	1,2
Мыс Кунгасный	93,79 \pm 33,96*	43,85 \pm 12,5*	2,58

Примечание: * – достоверное отличие ($P \leq 0,05$) по сравнению с гребешками из бух. Восточная.

Таким образом, данные показывают, что у гребешков, обитающих у м. Кунгасный, ДНК клеток жабр подвержена патологическим изменениям. Важно отметить, что гребешки, полученные из хозяйства марикультуры в бух. Северная, практически не имели повреждений в молекуле ДНК. Это свидетельствует о том, что садковое выращивание моллюсков не оказывает негативного воздействия на их жизнедеятельность.

5.2. *Crenomytilus grayanus*

Клетки моллюсков, обитающих на акватории с высокой антропогенной нагрузкой (бух. Горностай), формировали явно выраженные кометы, принадлежащие к классам С3 и С4 (табл. 7). Они указывают на значительные повреждения в молекуле ДНК, обусловленные негативным действием факторов среды обитания. В свою очередь, повреждения ДНК жаберных клеток, обнаруженные у моллюсков из бух. Алексеева, принадлежали преимущественно к классу С2, что характеризует клетки как жизнеспособные, но с выраженными повреждениями (рис. 11).

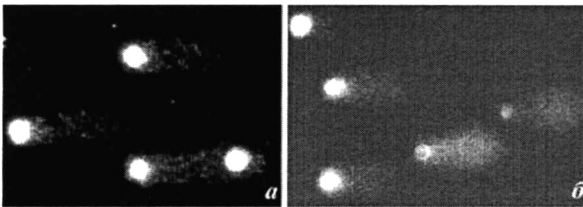


Рис. 11. Степень повреждения молекулы ДНК жаберной ткани *C. grayanus* (а) бух. Алексеева, о. Попов; (б) бух. Горностай

Как видно, % мигрированной ДНК в клетках жабр *C. grayanus*, доставленных из бухты Горностай, почти в 2 раза выше, чем у моллюсков из бух. Алексеева, а длина «хвоста» кометы выше в 4 раза (табл. 6).

Таблица 6. Основные параметры ДНК-комет клеток жабр *C. grayanus*, собранных в разных районах залива Петра Великого (среднее \pm стандартное отклонение, n = 15)

Район Показатель	Повреждение ДНК		
	Длина «хвоста» кометы (рх)	% ДНК в «хвосте» кометы	Индекс генетического повреждения (ИГП)
Бух. Алексеева (о. Попова)	25,4 \pm 3,32	21,65 \pm 5,9	1,99
Бух. Горностай (Уссурийский залив)	102,02 \pm 39,77*	38,61 \pm 10,86*	3,23

Примечание: * – достоверное отличие ($P \leq 0,05$) по сравнению с мидиями из б. Алексеева (о. Попова).

При негативном воздействии среды на моллюсков отмечается гетерогенность в выборке полученных комет. Важно отметить, что чем сильнее это воздействие, тем выборка гетерогеннее (рис. 12).

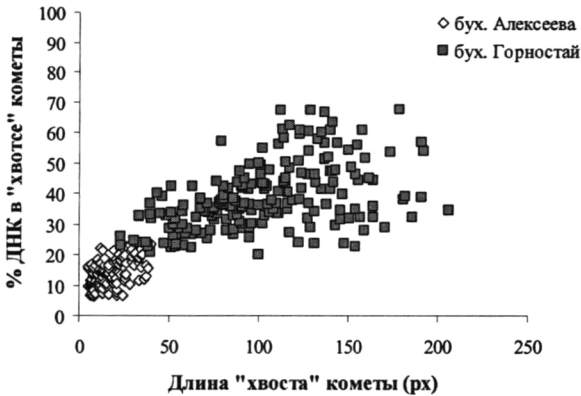


Рис. 12. Зависимость % мигрированной ДНК от длины «хвоста» комет, формируемых клетками жабр *S. grauanis*, обитающих на акваториях с разной антропогенной нагрузкой (n = 750)

Таким образом, в условиях хронического действия неблагоприятных условий среды наблюдается накопление повреждений в молекуле ДНК. Так, у животных, обитающих в бух. Горностай, процент повреждения ДНК клеток жабр значительно выше, чем у моллюсков, обитающих в бух. Алексеева. Отметим, что у мидий, обитающих в бух. Алексеева ИГП выше единицы (табл. 6). Возможно, это связано с тем, что в бухте обнаружены ртутные аномалии (Лучшева, 1995), которые могут оказывать негативное влияние на моллюсков.

5.3. *Corbicula japonica*

Полученные изображения ДНК-комет клеток жабр *C. japonica* (рис. 13) наглядно демонстрируют состояние молекулы ДНК моллюсков, обитающих в разных условиях. Так, у моллюсков, отобранных в эстуариях рек Артемовка и Партизанская, отмечались минимальные количества ДНК-разрывов, и такие клетки можно охарактеризовать как неповрежденные и жизнеспособные (классы C0/C1) (рис. 9 (а), (б)). Важно подчеркнуть, что для этих групп моллюсков характерно минимальное значение ИГП, не превышающее 1 (табл. 7).

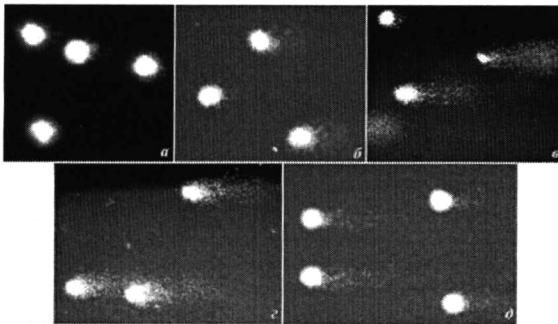


Рис. 13. Степень повреждения молекулы ДНК жаберной ткани *C. japonica* (а) эстуарий р. Артемовка; (б) эстуарий р. Партизанская; (в) эстуарий р. Раздольная; (г) лагуна Тихая; (д) лагуна Лебяжья.

Как можно видеть, кометы, формируемые клетками жабр корбикулы из лагуны Лебяжьей, принадлежали преимущественно к классу C2, в жаберной ткани отмечена повы-

шенная концентрация МДА. Возможно, причиной негативного влияния на моллюсков оказывает обнаруженная нами эвтрофикация вод лаг. Лебяжьей. В жаберных клетках моллюсков, обитающих в эстуарии р. Раздольная и примыкающей к ней лагуне Тихой, преобладали кометы с явно выраженными деструктивными изменениями, принадлежащие к классам С2, С3 и С4 (рис. 13). У данных моллюсков, также был отмечен высокий ИГП (табл. 7).

Параметры полученных комет (доля ДНК в «хвосте» кометы, длина «хвоста» кометы), отражающие степень повреждения ДНК клеток жабр моллюсков, а также содержание МДА, указывающее на активность перекисного окисления липидов, протекающего в жабрах, приведены в табл. 7. Анализ этих данных показывает, что в клетках жабр корбикул, отобранных в устье р. Раздольная и лагуне Тихой, значения указанных параметров существенно выше, чем в других группах моллюсков.

Таблица 7. Основные параметры ДНК-комет клеток жабр и концентрация МДА жаберной ткани моллюсков *C. japonica*, собранных в эстуариях рек и приморских лагунах залива Петра Великого (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 15$)

Показатель / Места сбора моллюсков	МДА (нмоль / г сырой ткани)	Повреждение ДНК		
		Длина «хвоста» кометы (рх)	% ДНК в «хвосте» кометы	Индекс генетического повреждения (ИГП)
Р. Артемовка	3,46 \pm 0,59	5,00 \pm 3,8	4,33 \pm 2,1	0,6
Р. Партизанская	5,62 \pm 0,82*	19,23 \pm 10,7*	14,79 \pm 6,45*	0,71
Р. Раздольная	12,85 \pm 0,52*	85,61 \pm 19,1*	36,55 \pm 5,97*	3,22
Лагуна Тихая	15,32 \pm 1,13*	73,96 \pm 22,45*	35,1 \pm 5,3*	3,11
Лагуна Лебяжья	8,49 \pm 1,18*	26,55 \pm 12,5*	23,2 \pm 5,33*	2,01

Примечание: * – достоверное отличие ($P \leq 0,05$) по сравнению с корбикулами из эстуария р. Артемовка

Важно подчеркнуть, что чем выше уровень МДА, тем больше процент поврежденности ДНК клеток жабр моллюсков. В результате сравнения выделились две группы районов зал. Петра Великого: 1) районы с низким уровнем содержания МДА и % мигрированной ДНК в жабрах моллюсков (эстуарии рек Артемовка и Партизанская); 2) с более высокими показателями обоих параметров (лагуны Лебяжья и Тихая и эстуарий р. Раздольная).

Положительная зависимость между этими двумя маркерами (повреждение ДНК и количество продуктов ПОЛ (МДА)) подтверждает тот факт, что, скорее всего, окислительный стресс является одной из причин деградации генома (Beckman, 1997; Collins, 2009).

Исходя из обзора литературных данных, можно сделать вывод, что результаты нашего исследования отражают сложившуюся обстановку по уровню загрязнения в зал. Петра Великого. Так, река Раздольная на сегодняшний день является одной из самых загрязненных рек в Приморском крае (Никулина, 2006). В отличие от других акваторий, в жабрах моллюсков обитающих здесь, отмечен максимальный процент поврежденных ДНК клеток и уровень МДА, (табл. 7).

На прилегающей к рекам Артемовка и Партизанская территории в последние годы наблюдается спад производства, в связи с чем уровень загрязнения в эстуариях рек снизился. Наши результаты подтверждают, что состояние вод эстуариев этих рек (Артемовка, Партизанская) улучшилось, так как по данным кометного анализа генотоксических эффектов не наблюдалось (рис. 13). Кроме того, здесь были отмечены минимальные концентрации МДА в жаберной ткани моллюсков (табл. 7).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что неблагоприятная среда обитания может инициировать серьезные нарушения в структуре молекулы ДНК, ко-

торы, в свою очередь, могут привести к возникновению мутаций и злокачественных трансформаций клетки.

В заключение можно отметить, что метод ДНК-комет обладает достаточной чувствительностью, необходимой для регистрации повреждений ДНК на уровне отдельной клетки и может быть применен для оценки генотоксичности морской среды.

ВЫВОДЫ

1. Аккумуляция кадмия вызывает деструктивные изменения молекулы ДНК в клетках жабр изученных двустворчатых моллюсков *Corbicula japonica*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Modiolus kurilensis*. Корбикула японская отличается от других видов моллюсков высокой скоростью накопления кадмия в жабрах и скоростью образования повреждений молекулы ДНК.

2. Установлено, что дефицит кислорода в среде обитания (аноксия) приводит к деструкции ДНК клеток жабр *Corbicula japonica*, *Mizuhopecten yessoensis*.

3. Реоксигенация способствует восстановлению ДНК у гребешков после действия аноксии.

4. С помощью метода ДНК-комет у *C. japonica*, обитающих в лагуне Лебяжьей, были отмечены повреждения молекулы ДНК вследствие естественной аноксии, вызванной застойными процессами и нарушением обмена вод вследствие строительства дамбы и моста.

5. Выявлена глубокая деградация молекулы ДНК у корбикул, обитающих в эстуарии р. Раздольная и лагуне Тихая, у гребешков на акватории, прилегающей к г. Владивосток (м. Кунгасный), и у мидий в бух. Горностаев. Отмечено, что деструктивным изменениям подвержена практически 1/3 часть молекулы ДНК клеток жабр моллюсков.

6. Показана возможность и перспективность использования метода ДНК-комет в качестве биомаркера загрязнения прибрежных акваторий залива Петра Великого.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в ведущих научных рецензируемых журналах

1. Слободскова В. В., Солодова Е. Е., Слинько Е. Н., Челомин В. П. Оценка генотоксичности кадмия в клетках жабр двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* с помощью метода ДНК-комет // Биология моря. 2010. Т. 36, № 4. С. 303-308.

2. Слободскова В.В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. Использование моллюска *Corbicula japonica* (Bivalvia) для оценки генотоксичности эстуарных вод // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2011. № 2. С. 86-91.

3. Слободскова В.В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. Генотоксический мониторинг морских лагун залива Петра Великого // Известия Самарского Научного Центра РАН. 2011. Т. 13, № 1 (6). С. 1382-1385.

Статьи, опубликованные в других периодических изданиях и монографиях

3. Slobodskova V. V., Solodova E. E., Chelomin V. P. DNA damage (Comet assay) as biomarker of Cd exposure in marine seed scallops *Mizuhopecten yessoensis* age 1 year // Journal of Environmental Science and Engineering. 2010. Vol. 4, no. 10 (Serial no. 35). P. 63-69.

4. Слободскова В.В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. Применение генотоксического анализа для мониторинга эстуарной зоны рек Раздольной и Артемовки (Приморский край) // Чтения памяти В. И. Леванидова. Вып. 5. Сборник научных статей. Владивосток: Дальнаука, 2011. С. 487-492.

5. Слободскова В. В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. Применение генотоксического анализа для мониторинга прибрежной зоны залива Петра Великого // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Том 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Сборник научных статей – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. С. 272-278.

Доклады на международных и научных конференциях

6. Слободскова В. В., Солодова Е. Е. Биохимическая оценка состояния *Mizuhopecten yessoensis* при различных способах культивирования // Исследования Мирового океана: Матер. Междунар. науч. конф. Владивосток: Дальрыбвтуз, 2008. С. 68-70.
7. Слободскова В. В., Солодова Е. Е. Использование метода ДНК-комет для оценки состояния *Mizuhopecten yessoensis* культивируемого различными способами // Труды VI юбилейной международной научной конференции «Инновации в науке и образовании-2008», посвященной 50-летию пребывания КГТУ на Калининградской земле. Часть 1. с. 106-107.
8. Slobodskova V.V., Solodova E. E., Chelomin V. P. DNA damage (Comet Assay) as biomarker of Cd exposure in marine seed scallops *Mizuhopecten yessoensis* age 1 year // Beyond observations to achieving understanding and forecasting in a changing North Pacific: Forward to the FUTURE (PICES Seventeenth Annual Meeting) // October 24 – November 2, 2008 Dalian, People's Republic of China. P. 28.
9. Слободскова В. В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. Метод ДНК – комет как тест на генотоксичность // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии. Материалы VIII региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России. – Владивосток: Изд-во Дальневост. Ун-та, 2008, С. 129-131.
10. Слободскова В. В., Солодова Е. Е. Повреждение ДНК клеток жабр двусторчатого моллюска *Corbicula japonica* при аккумуляции кадмия // Океанологические исследования: 4-я конф. молодых ученых, 18-22 мая 2009 г., Владивосток, Россия: тез. докл. / Рос. акад. наук, Дальневост. Отд-ние, Тихоокеан. океанол. Ин-т им. В. И. Ильичева. – Владивосток: ТОИ ДВО РАН, 2009. С. 76.
11. Слободскова В.В., Солодова Е.Е., Челомин В.П. Оценка состояния морских прибрежных экосистем с использованием метода ДНК-комет // Геология. География и экология океана: Материалы Международной научной конференции, посвященной 100 - летию со дня рождения Д.Г. Панова (8 - 11 июля 2009 г., г. Ростов-на-Дону). Ростов-на-Дону. 2009. с. 310 - 311.
12. Slobodskova V.V., Solodova E.E., Chelomin V.P. DNA damage in gill cells of *Mizuhopecten yessoensis* exposed to natural and anthropogenic stressors // 17th International Pectinid Workshop: Santiago de Compostela, Spain. April 22-28, 2009. Book of Abstracts. P. 111.
13. Слободскова В. В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. «Применение генотоксического анализа для мониторинга прибрежной зоны залива Петра Великого» // III Международная конференция с элементами школы для молодых ученых, аспирантов студентов «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» 22-26 июня 2010г., г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, с.172-173.
14. Slobodskova V. V., Solodova E. E., Chelomin V.P. «DNA strand breakage in aquatic organisms as a biomarker in the environmental monitoring» // PICES 2010 Annual Meeting. North Pacific Ecosystems Today, and Challenges in Understanding and Forecasting Change, North Pacific Marine Science Organization, Portland, OR, U.S.A., p. 128-129.
15. Слободскова В.В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. Оценка генотоксичности прибрежных морских акваторий на основе метода ДНК-комет // Всероссийская научная молодежная конференция-школа, 16-22 сентября 2010г., «Проблемы экологии морского шельфа», Владивосток, ДВГУ, с. 149-151.
16. Слободскова В.В., Солодова Е. Е. Мониторинг прибрежных биоценозов залива Петра Великого на основе генотоксического анализа // Материалы 3 региональной конференции молодых ученых, 28 августа-4 сентября 2010 г., Современные проблемы геологии, геохимии и геоэкологии Дальнего Востока России, Владивосток, ДВГИ ДВО РАН, с. 150-152.

17. Слободскова В.В., Солодова Е. Е. Экотоксикологическая оценка прибрежной зоны залива Петра Великого на основе метода ДНК-комет // Океанологические исследования: IV конференция молодых ученых, 21-25 апреля 2011 г., Владивосток:ТОИ ДВО РАН, с. 119-121.

18. Слободскова В. В., Солодова Е. Е., Челомин В. П. Деструкция ДНК клеток жабр двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* обитающего в приливно-отливной зоне // Вторая Всероссийская научная молодежная конференция-школа «Проблемы экологии морского шельфа», Владивосток, 5-11 сентября 2011г. с.108.

Слободскова Валентина Владимировна

**ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ
НА МОРСКИХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ**

АВТОРЕФЕРАТ

**Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Специальность: 03.02.08 – экология

**Подписано в печать 05.04.2012.
Формат 60x84/16 Объем 1,0 уч.-изд.-л.
Тираж 100 экз. Заказ № 105**

**Отпечатано с авторского оригинал-макета
в ТОИ ДВО РАН 690041, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43**

10^{-2}