

УДК 577.1:577.41

**Слободскова В.В., Солодова Е.Е., Челомин В.П.**  
Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева  
Дальневосточного отделения РАН (г. Владивосток)

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЛЮСКА *CORBICULA JAPONICA* (BIVALVIA) ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ЭСТУАРНЫХ ВОД

**V. Slobodskova, E. Solodova, V. Chelomin**

*V.I.Ilichev Pacific Oceanological Institute of the Far Eastern Branch of RAS (Vladivostok)*

## USE OF THE MOLLUSC *CORBICULA JAPONICA* (BIVALVIA) TO ESTIMATE GENOTOXICITY OF ESTUARINE WATERS

**Аннотация.** В работе представлены результаты исследования по выявлению генотоксичности среды обитания *Corbicula japonica* населяющей разные районы залива Петра Великого. Для выявления генотоксических эффектов был использован метод ДНК - комет. Выяснено, что моллюски, обитающие в акватории р. Раздольная, находятся под влиянием антропогенного загрязнения, так как 1/3 молекулы ДНК жабрных клеток *C. japonica* имеет ярко выраженные деструктивные изменения. Отмечена положительная зависимость между степенью повреждения молекулы ДНК и уровнем накопления продуктов перекисного окисления липидов. Это свидетельствует о том, что моллюски, обитающие в местах с антропогенной нагрузкой, находятся в состоянии окислительного стресса, который является ключевым механизмом при деградации молекулы ДНК.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, малоновый диальдегид, двустворчатые моллюски, *Corbicula japonica*, метод ДНК-комет, повреждение ДНК.

**Abstract:** The paper presents the results of the study to identify genotoxicity of the environment of *Corbicula japonica* inhabiting different sites of Peter the Great Bay. To reveal the genotoxic effects we have used the comet assay. It has been found out that the molluscs inhabiting the Razdolnaya river are under the influence of anthropogenic pollution, as 1/3 of the genome of *C. japonica* gill cells has a pronounced destructive changes. The positive correlation between the degree of DNA damage and the level of accumulation of lipid peroxidation products has been detected. This indicates that the molluscs that live in areas with anthropogenic influence are in a state of oxidative stress, which is a key mechanism for the degradation of DNA molecule.

**Key words:** oxidative stress, malondialdehyde, Bivalves, *Corbicula japonica*, genotoxicity, Comet Assay, DNA damage.

Растущие масштабы производства и использования широкого спектра химических соединений в различных областях народного хозяйства приводят к хроническому загрязнению прибрежных морских акваторий.

Наиболее ощутимые последствия антропогенной деятельности выявляются в экосистемах морских лагун и эстуариев крупных рек. В последние годы с речным стоком в эти области поступают воды, сильно загрязненные различными химическими соединениями, включая тяжелые металлы, пестициды и нефтеуглеводороды. Часть этих загрязнений накапливается в донных отложениях и усваивается различными гидробионтами. Кроме того, для водных масс этих районов характерны резкие изменения многих гидрохимических факторов – температуры, солености, концентрации кислорода, мутности и других, которые

непосредственно оказывают существенное влияние на жизнедеятельность обитающих в этом месте живых организмов. В свою очередь, вариабельность физико-химических факторов может изменять биодоступность и, соответственно, токсичность загрязнителей. Поэтому в таких зонах с нестабильной экологической обстановкой возникает множество комбинаций синергических, антагонистических и маскирующих эффектов антропогенных факторов, что в значительной степени затрудняет использование традиционных гидробиологических методов оценки негативных изменений в экосистемах. Более того, они не позволяют оперативно оценить экотоксикологическую ситуацию в акваториях, и нередко информация, собранная с их помощью, может быть проанализирована тогда, когда результаты воздействия проявятся на экосистемном уровне и приобретут необратимый характер.

В этой связи представляется целесообразным применение подходов, основанных на анализе отдельных ключевых биохимических параметров (молекулярных маркеров), отражающих общее изменение физиологического состояния организма в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды. 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 изучения генотоксичности [5, 109]. Подобного рода исследования в экотоксикологии только начинаются [8, 348; 17, 303]. Но именно в этом направлении следует ожидать появления интересных научных публикаций, учитывая широкое распространение в медико-биологических исследованиях метода-ДНК-комет, позволяющего оценивать состояние генома индивидуальной клетки [7,

207].

Наиболее доступными и удобными объектами биомаркерных исследований в экосистемах побережья Японского моря являются двустворчатые моллюски-фильтраторы *Corbicula japonica* – доминанты эстуарных донных сообществ [20]. Они характеризуются относительно крупными размерами и высокой численностью, легко доступны для отбора, что позволяет использовать их как для химического анализа загрязнений, так и для изучения биологических реакций на них.

Основная задача настоящей работы заключалась в том, чтобы с помощью метода ДНК-комет показать (выявить) уровень повреждения ДНК в клетках жабр моллюсков *Corbicula japonica*, испытывающих воздействие комплексного загрязнения водной среды. Для исследований были выбраны эстуарии рек Раздольная (Амурский залив) и Артемовка (Уссурийский залив), а также лагуна Лебяжья залива Петра Великого, характеризующихся различной степенью загрязнения [15, 595].

#### Материал и методы

В работе использовали половозрелых особей (размер 30 – 34 мм) эстуарного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica*.

Отбор моллюсков проводился в весеннее время, при температуре воды примерно 15 – 16 °С, в устье реки Артемовка (Уссурийский залив), в устье реки Раздольная (Амурский залив) и в лагуне Лебяжья (Славянский залив) водолазным способом. Выловленных моллюсков доставляли в лабораторию в течение 2-х часов.

После 2-дневной адаптации при температуре 16 – 18 °С проводили исследование уровня накопления МДА и степени повреждения молекулы ДНК жабрных клеток *C. japonica*, обитающей в разных районах залива Петра Великого.

В работе использовали щелочной вариант кометного анализа, адаптированного к морским организмам [17, 303].

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли непосредственно в жа-

берной ткани [1, 302] по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

### Результаты и обсуждение

При визуальном анализе было видно, что после электрофореза молекула ДНК клеток жабр *S. japonica*, собранной в устье реки Артемовка и лагуне Лебяжья, образует симметричное яркое ядро (полость в агарозе, заполненную ДНК) и окружающее его «гало», представленное вышедшими в агарозу петлями высокополимерной ДНК. В то же время в клетках жабр моллюсков, отобранных в устье реки Раздольная, молекула ДНК образует хорошо выраженные кометы, что, очевидно, обусловлено деградацией генома и миграцией низкополимерных фрагментов ДНК. Исходя из классификации, предложенной Коллинзом с коллегами [3, 69], клетки жабр моллюсков, обитающих в устье реки Артемовка и лагуне Лебяжья, образуют кометы, которые можно отнести к двум классам С0 и С1. Нередко бывает трудно визуально обнаружить разницу между кометами этих двух классов, поэтому они объединяются в одну группу (С0/С1)-комет, характерных для неповрежденных и жизнеспособных клеток [19, 115]. При этом было отмечено, что в группе клеток у моллюсков из лагуны Лебяжьей преобладали кометы, принадлежащие к классу С1, а также наблюдались клетки класса С2, но в малом количестве. Кометы, формируемые клетками жабр корбикулы, населяющей устье реки Раздольная, можно

отнести преимущественно к классу С3, что свидетельствует о высоком уровне фрагментации молекулы ДНК.

В таблице приведены рассчитанные параметры полученных комет (доля ДНК в хвосте кометы - % DNAt, длина хвоста кометы – Lt), отражающие степень повреждения ДНК клеток жабр моллюска, а также содержание МДА, указывающее на активность перекисного окисления липидов, протекающего в жабрах (см. табл.). Анализ этих данных показывает, что в клетках жабр корбикулы, отобранных в устье реки Раздольной, значения указанных параметров существенно выше, чем в других группах моллюсков.

Для наглядности полученные экспериментальные данные, из которых были рассчитаны усредненные значения полученных ДНК-комет (табл.), были представлены на рис. 1 в виде зависимости % ДНК в хвосте и длиной «хвоста» кометы. Этот вид бивариантного распределения обычно используется для характеристики популяций и наглядно демонстрирует пределы значений параметров, характеризующих кометы и их взаимосвязь. Из представленных результатов (рис. 1) особенно отчетливо видна высокая гетерогенность структуры ДНК клеток жабр моллюсков, подвергшихся неблагоприятному воздействию факторов среды (р. Раздольная). При этом доля ДНК, мигрирующей из ядра кометы, в клетках моллюсков, обитающих в устье реки Артемовка и лагуне Лебяжья, не превышает 10 и 12% соответственно, тогда как

Таблица

### Основные параметры ДНК-комет клеток жабр и концентрация МДА жаберной ткани моллюсков *S. japonica*, собранных в разных районах залива Петра Великого

Показатель Места сбора моллюсков	МДА (нмоль/г сырой ткани)	Повреждение ДНК	
		Lt	% DNAt
р. Артемовка	3,46±0,89	7,56±3,4	4,33±2,1
р. Раздольная	15,32±1,13	91,18±38,1	40,90±12,05
лагуна Лебяжья	8,51±0,77	36,25±14,92	20,79±8,40

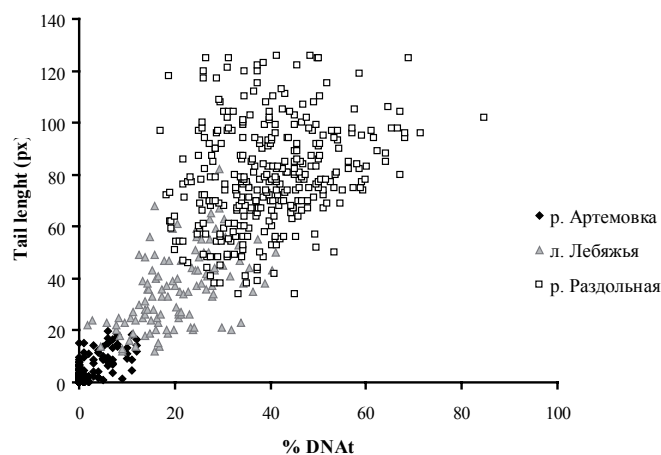


Рис. 1. Корреляция между процентом мигрированной ДНК (%DNAt) и длиной хвоста (Lt) комет, формируемых клетками жабр *C. japonica*, собранной в разных районах залива Петра Великого.

в клетках моллюсков, полученных из устья реки Раздольной, этот показатель для основной массы комет составляет 40–45%.

Подобная вариабельность данных параметров (рис. 1) была отмечена авторами в экспериментальных условиях, при исследовании генотоксичности кадмия в клетках жабр *C. japonica* и *Mizuhopecten yessoensis* [17, 303; 13, 63].

Наши результаты подтверждают тот факт, что эффект стрессового воздействия, вызванного загрязнением среды обитания, инициирует в первую очередь ответную реакцию клеточных систем. Увеличение количества повреждений молекулы ДНК, вызванных неблагоприятной средой обитания, отмечено разными авторами у моллюсков [4, 246; 12, 133; 6, 471; 11, 167; 18, 272], ракообразных [9, 553], рыб [10, 345], амфибий [2, 227]. Повышение уровня ПОЛ (МДА) в тканях гидробионтов также свидетельствует о негативном воздействии факторов среды [14, 358].

Нами было отмечено, что в жабрах моллюсков из трех исследованных районов показатели уровня накопления продуктов ПОЛ (МДА) и повреждений молекулы ДНК значительно отличались друг от друга. Так, например, содержание малонового диальдегида в жабрах моллюсков, обитающих в устье р. Раздольной, выше, чем у моллюсков, отобранных в лагуне Лебяжьей и устье р.

Артемовка, в 2 и 4 раза соответственно. По уровню повреждения ДНК жаберных клеток корбикулы наблюдается схожая картина, где максимальная деградация ДНК обнаружена у животных, собранных в эстуарии р. Раздольная.

На рис. 2 представлена зависимость таких показателей, как повреждение ДНК клеток жабр (%DNAt) и уровень МДА жаберной ткани *C. Japonica*, обитающей на разных акваториях залива Петра Великого. Проследивается четкая зависимость между этими двумя характеристиками. Показано, что чем выше уровень МДА, тем больше процент поврежденности клеточной ДНК. Полученные данные наглядно демонстрируют, что у моллюсков, обитающих в устье р. Раздольная, уровень МДА жаберной ткани и % поврежденной ДНК жаберных клеток значительно выше, чем у корбикул, отобранных в устье реки Артемовки и лагуне Лебяжья.

Положительная корреляция между этими двумя маркерами (повреждение ДНК и количество продуктов ПОЛ (МДА)) подтверждает тот факт, что именно окислительный стресс является ключевым механизмом деградации генома.

Анализ литературы и результаты нашего исследования позволяют сделать вывод об уровне антропогенной нагрузки исследованных акваторий. Так, например, река Раздоль-

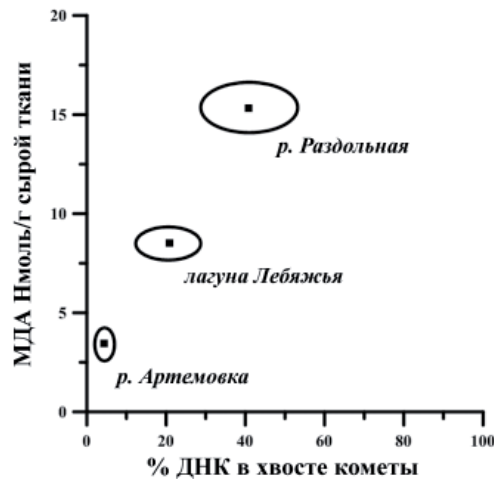


Рис. 2. Корреляция между процентом мигрированной ДНК (%DNA) жабрных клеток и содержанием малонового диальдегида (МДА) в жабрах *C. japonica*, собранной в разных районах залива Петра Великого.

ная на сегодняшний день является одной из самых загрязненных рек в Приморском крае [18, 272]. Среднее течение реки находится в зоне достаточно интенсивного сельскохозяйственного возделывания земель, а ниже подвергается мощному антропогенному прессингу: именно здесь расположены стоки коллекторов г. Уссурийска, железнодорожных предприятий, мясокомбината, сахарного завода, картонной фабрики и кожевенного комбината. Оказывает негативное влияние на состав вод реки Раздольной и интенсивно развивающееся хозяйство северных провинций Китая, расположенных в ее верховье. Такое комплексное антропогенное воздействие отражается на состоянии гидробионтов, что наглядно демонстрируют наши результаты. На рис. 2 видно, что моллюски, населяющие реку Раздольную, имеют максимальное количество повреждений ДНК и самый высокий уровень содержания МДА в жабрах.

Лагуна Лебяжья находится в отдаленном районе залива Петра Великого, данный регион характеризуется отсутствием промышленности и считается одним из самых незагрязненных районов залива Петра Великого. Но отрицательную роль в водных экосистемах играет не только загрязнение водной среды, но и строительство дамб, мостов, карьеров, водохранилищ и т. д. Так, строительство дамбы и моста через лагуну Лебяжью привели к

нарушению гидрологического режима в этом водоеме. Прежде всего, нарушился водообмен и солевой режим, изменился тепловой баланс. Все это приводит к эвтрофикации, накоплению на дне илистых отложений, что в свою очередь сильно отражается на состоянии гидробионтов [16, 276]. Наши результаты свидетельствуют о том, что *C. japonica*, населяющая данную акваторию, действительно подвергается негативному влиянию (рис. 2).

На прилегающей территории р. Артемовка в последние годы наблюдается спад производства, в связи с чем уровень загрязнения в реке снизился. И, по нашим результатам, можно сделать вывод, что состояние вод р. Артемовки улучшилось, т. к., по данным кометного анализа, генотоксических эффектов не наблюдается (рис.1), а также отмечается минимальная концентрация МДА в жабральной ткани моллюсков (табл.).

В заключение можно отметить, что в ходе проведенного эксперимента нами выявлена четкая взаимосвязь между количеством повреждений молекулы ДНК и уровнем продуктов перекисного окисления (МДА) в жабрах двусторчатого моллюска *C. japonica*, собранного из мест с различной степенью антропогенной нагрузки. В результате этого можно с уверенностью говорить о том, что моллюски, обитающие в загрязненной акватории, находятся в состоянии хронического окислитель-

ного стресса, который является основной причиной деградации генома клетки.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // In: *Methods in Enzymology*. Academic Press. N.Y., 1978. V. 52.
2. Clements C., Ralph S., Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay // *Environ. Mol. Mutagen.* 1997. V. 29.
3. Collins A.R., Ma A.G., Duthie S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells // *Mutat. Res.* 1995. V. 336.
4. Cotelle S., Ferand J.F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review // *Environ. Mol. Mutagen.* 1999. V. 34.
5. Depledge M.H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates // *Mutat. Res.* 1998. V. 399.
6. Hamoutene D., Payne J.F., Rahimtula A., Lee K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons // *Mar. Environ. Res.* 2002. V. 54.
7. Jha A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay // *Mutagen.* 2008. V. 23. № 3.
8. Lam P. Use of biomarkers in environmental monitoring // *Ocean & Coastal Management* 2009. V. 52.
9. Lee R., Kim G.B., Maruya K.A., Steinert S.A., Oshima Y. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants // *Mar. Environ. Res.* 2000. V. 50.
10. Pandrangi R., Petras M., Ralph S., Vizoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp // *Environ. Mol. Mutagen.* 1995. V. 26.
11. Regoli F., Frenzili G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // *Aquat. Toxicol.* 2004. V. 68.
12. Sasaki U.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ishibashi S., Tsuda N., Matsusaka N., Asano N., Saotome K., Sofumi T., Hayashi M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study // *Mutat. Res.* 1997. V. 393.
13. 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. V. 4. № 10.
14. Довженко Н.В., Куриленко А.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Окислительный стресс, индуцируемый кадмием, в тканях двустворчатого моллюска *Modiolus modiolus* // *Биология моря*. 2005. Т. 31. № 5.
15. Нигматулина Л.В. Сравнительная оценка поступления загрязняющих веществ со сточными водами на акваторию Амурского и Уссурийского заливов (Японское море) // Современное состояние водных биоресурсов: материалы научной конференции, посвященной 70-летию С.М. Коновалова. Владивосток 25-27 марта 2008 г. В.: ТИНРО-центр, 2008.
16. Раков В.А. Современное состояние, перспективы использования и сохранения экосистем морских лагун и эстуариев юга Дальнего Востока // *Природа без границ: Материалы I Международного экологического форума*. Ч. 1. Вл-к., 2006.
17. 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.
18. 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*. Т. 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Сборник научных статей – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010.
19. Тронов В.А., Терещенко Д.Г., Конопляников М.А. Механизм радиационной гибели лимфоцитов периферической крови человека, оцениваемая методом ДНК-комет // *Биофизика*. 1998. Т. 43, № 1.
20. Явнов С.В., Раков В.А. Корбикула. В.: ТИНРО-центр, 2002.