

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՄԻՄՈՆՅԱՆ ԱՆՆԱ ԷԴԻԿԻ

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՈՐՈՇ ՏԱՐԱԾՔՆԵՐԻ ԳԵՆԱԹՈՒՆԱՅԻՆ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐՈՎ
ԱՂՏՈՏՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ ՏԱՐԲԵՐ ԿԵՆՍԱՑՈՒՑԻՉՆԵՐԻ
ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ**

Գ.00.15 - «Գենետիկա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2016

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

СИМОНЯН АННА ЭДИКОВНА

**ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ
НЕКОТОРЫХ РАЙОНОВ АРМЕНИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ
БИОИНДИКАТОРОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.15- «Генетика»

ЕРЕВАН – 2016


Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝	Կ.գ.դ., դոցենտ Գ.Գ. Հովհաննիսյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	Կ.գ.դ., պրոֆ. Թ.Ֆ. Սարգսյան Կ.գ.թ., դոցենտ Կ.Ա. Ղազարյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2016թ. դեկտեմբերի 21-ին, ժամ 14⁰⁰-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փողոց 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2016թ. նոյեմբերի 18-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
Կ.գ.թ., դոցենտ  Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: д.б.н., доцент Г.Г. Оганесян


Официальные оппоненты: д.б.н., проф. Т.Ф. Саркисян
к.б.н., доцент К.А. Казарян

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 21-го декабря 2016г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 051 по биофизике при Ереванском государственном университете (РА, 0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 18-го ноября 2016г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051
к.б.н., доцент  М.А. Парсаданян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Необходимость экологического мониторинга окружающей среды обусловлена масштабным загрязнением воды, почвы и воздуха продуктами антропогенной деятельности. Загрязнители вызывают негативные изменения у обитающих в этой среде организмов, а также прямо или косвенно наносят вред здоровью человека. Особую опасность представляют генотоксические/мутагенные соединения, длительное воздействие которых сопровождается накоплением повреждений ДНК и изменением активности системы репарации, что может привести к возникновению мутаций и сокращению популяционного разнообразия организмов. В связи с этим оценка уровня генетической опасности антропогенного загрязнения среды для живых организмов, включая человека, является важной проблемой экологического мониторинга.

Эффективный генетический мониторинг основан на сочетании методов химического анализа с генетическим тестированием, позволяющим оценивать как количественное содержание токсических веществ, так и последствия действия загрязнителей на живые организмы. В настоящее время наиболее эффективным считается *in situ* генетический мониторинг уровня загрязнителей непосредственно на природных популяциях организмов, обитающих на обследуемой территории. Важнейшим преимуществом такого подхода является возможность оценки суммарного воздействия загрязнителей среды. Целесообразно, чтобы биоиндикаторные организмы принадлежали к различным таксонам животных и растений, так как виды и даже популяции внутри вида могут иметь различную чувствительность к загрязнителям (Angeletti and Carere, 2014).

Чувствительными биоиндикаторами загрязнения воды генотоксикантами являются рыбы и раки, которые активно метаболизируют и накапливают в организме содержащиеся в воде химические соединения (Ali et al., 2008; Kuklina et al., 2014; Klobučar et al., 2014). Для оценки генотоксичности загрязнителей почвы чаще всего исследуют ящериц и мышей. Наиболее ценными объектами экологических исследований могут служить генетически идентичные линии партеногенетических ящериц. Несмотря на то, что рептилии являются чувствительными биоиндикаторами, в настоящее время их использование в экотоксикогенетике ограничено (Hopkins, 2000; Oyekunle et al., 2012).

Мелкие млекопитающие, в частности, мыши, являются идеальными объектами для генетического мониторинга, так как позволяют оценивать риск для обитающих в загрязненных зонах популяций человека (Talmage and Walton, 1991; Ieradi et al., 1996). Для биоиндикации загрязнителей, как воды, так и почвы, также используют растительные тест-системы (Maluszynska et al., 2005), в частности, традесканцию, которая отличается высокой чувствительностью к действию широкого спектра генотоксикантов (Ma et al., 1994). В Армении изучение генетических эффектов действия загрязнителей среды было проведено на озёрной лягушке *P. ridibundus*, жуках *R. fulva* и *S. tonsa*, улитке *H. derbentina* (Harutyunyan et al., 2014), ящерицах *D. nairensis* и *D. armeniaca* (Stepanyan et al., 2015) и традесканции (Атоянц, 1998; Матевосян, 2006).

В экотоксикогенетических исследованиях для оценки повреждений ДНК и хромосом наиболее широко применяют методы ДНК-комет (De Lapuente et al., 2015) и микроядер (Bolognesi and Hayashi 2011). Эффективность генетического мониторинга с применением методов ДНК-комет и микроядер показана на ящерицах (Schaumburg et al., 2012), мышей (Mitkovska et al., 2012, Mateos et al., 2008) и раках (Klobučar et al., 2014). К 2015 г. более 300 публикаций посвящено применению метода ДНК-комет на рыбах (De Lapuente et al., 2015), которые также широко исследуются с помощью микроядерного теста (Cavas and Ergene-Gozukara 2005). Эти методы являясь комплементарными демонстрируют высокую чувствительность для обнаружения эффектов генотоксических веществ (Mouchet et al.,

2005). Одновременное использование нескольких тестов позволяет более полноценно оценивать генотоксические эффекты, особенно у диких видов, поскольку вариабельность в их чувствительности может быть выше, чем у лабораторных животных (Tarisso et al., 2009). При действии ксенобиотиков тест-система традесканции позволяет оценивать частоту соматических мутаций в волосках тычиночных нитей и микроядер в тетрадах микроспор (Grant, 1992)

В связи с возрастающим загрязнением водных и почвенных экосистем в Армении генетический мониторинг становится одной из приоритетных задач. Разнообразие локального состава и уровня загрязнения окружающей среды обуславливает необходимость поиска методов оценки и тест-объектов, адекватно отражающих уровень антропогенной нагрузки на экосистемы. Оценка суммарной генотоксичности с применением биоиндикаторов позволяет оценивать степень генетического риска загрязнения среды для популяций растений, животных и человека.

Целью исследования была оценка загрязнения генотоксическими факторами воды и почвы в некоторых районах Армении с использованием животных и растительных тест-объектов и биомаркеров.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Анализ повреждений ДНК в эритроцитах серебрянных карасей *Carassius auratus gibelio* и гемоцитах речных раков *Astacus leptodactylus*, обитающих в различных участках бассейна оз. Севан с неодинаковым уровнем загрязнения.
2. Оценка мутагенности водных проб из тех же участков бассейна оз. Севан на тест-объекте традесканции с учетом частоты рецессивных соматических мутаций в волосках тычиночных нитей и микроядер в тетрадах микроспор.
3. Оценка повреждений ДНК и хромосом в эритроцитах двуполых ящериц *Darevskia raddei* и партеногенетических ящериц *Darevskia armeniaca*, распространенных на территориях с относительно низким и высоким уровнем загрязнения.
4. Изучение чувствительности к загрязнителям среды у двуполых и партеногенетических ящериц рода *Darevskia*.
5. Оценка повреждений ДНК в лейкоцитах малой лесной мыши *Apodemus uralensis*, обитающей в ареалах с различной степенью загрязнения.
6. Оценка генотоксичности почв с различным уровнем загрязнения с использованием тест-объекта традесканции.
7. Определение корреляции между уровнем генетических нарушений у биоиндикаторных организмов и содержанием загрязнителей окружающей среды.
8. Сравнение чувствительности использованных биоиндикаторов загрязнения воды и почвы Армении.

Научная новизна

- Впервые в Армении проведено экотоксикогенетическое исследование водных и почвенных экосистем с одновременным использованием в качестве тест-объектов животных (раков, рыб, ящериц и мышей) и растительных (традесканция) биоиндикаторных организмов.
- Установлены показатели спонтанной частоты генетических нарушений распространенных в Армении популяциях серебрянных карасей *C. auratus gibelio*, речных раков *A. leptodactylus*, партеногенетических ящериц *D. unisexualis* и *D. armeniaca*, двуполых ящериц *D. raddei* и малой лесной мыши *A. uralensis*.
- Показано, что антропогенное загрязнение бассейна оз. Севан вызывает генетические повреждения у обитающих в Севане рыб и раков. Генотоксичность проб воды подтверждена на тест-объекте традесканции.

- Выявлено, что антропогенное загрязнение почв в Армении вызывает генетические повреждения у ящериц рода *Darevskia*. Генотоксичность почв подтверждена также на тест-объекте традесканции.
- Обнаружено, что рептилии более чувствительны к воздействию ксенобиотиков окружающей среды, чем млекопитающие, а партеногенетические ящерицы *D. unisexualis* - в сравнении с двуполоыми ящерицами *D. raddei*. В целом, установлено, что чувствительными биоиндикаторами почвы и воды являются как животные, так и растительные биоиндикаторы.
- Разработаны подходы к проведению генетического мониторинга загрязнения воды и почв Армении, основанного на оценке повреждений ДНК и хромосом у животных и растений. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание генетических процессов в природных популяциях, подверженных загрязнению ксенобиотиками.

Практическая ценность работы. С использованием животных и растительных биоиндикаторов получена суммарная характеристика генотоксичности экосистемы воды оз. Севан и почвы различных районов Армении. На основе результатов повреждений ДНК и хромосом у водных и наземных организмов выявлен значительно более высокий уровень генетического риска на территориях с повышенным уровнем загрязнения среды и его возможного последствия для природных популяций организмов. Полученные результаты могут служить основой для организации системы комплексного генетического мониторинга загрязнения природной среды в Армении.

Апробация работы. Результаты, вошедшие в работу, были представлены и доложены на Международной конференции молодых ученых “Perspectives for development of molecular and cellular biology-3” (Ереван, Армения, 26-29 сентября, 2012г.), на IV Международной конференции “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology, and evolution” (Санкт-Петербург, Россия, 2-6 июня, 2015г.), на III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, Россия, 4–9 октября 2015г.) и Всероссийской научной конференции “Экологическая стратегия развития прибрежных регионов: география, окружающая среда, население. Медико-экологические и социально экономические проблемы прибрежных регионов” (Ростов-на-Дону, Россия, 15–18 декабря 2015г.). По теме диссертации опубликовано 8 статей и 4 тезиса.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 109 страницах, состоит из списка использованных сокращений, введения, обзора литературы, описания методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 14 рисунков и 39 таблиц. Автор выражает глубокую благодарность за помощь в проведении совместных исследований и обсуждении результатов работы д.б.н. М.С. Аракелян, д.б.н. Б.К. Габриеляну, к.х.н. С.Г. Минасяну, к.б.н. Э.А. Агаджанян, к.б.н. Р.Э. Авалян, к.б.н. А.Л. Атоянц и коллективу кафедры генетики и цитологии биологического факультета ЕГУ.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, показаны ее научная новизна и практическая ценность исследований.

Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы включает подробный анализ принципов экотоксикогенетических исследований, характеристику биоиндикаторных организмов, чувствительных к загряз-

нителям окружающей среды, а также эффективность их применения для оценки генотоксичности воды и почвы. Обсуждаются проблемы оценки суммарной генотоксичности, а также идентификации конкретных загрязнителей с мутагенными свойствами. Представлены методы, применяемые в экотоксикогенетике.

Глава 2. Материалы и методы

Пункты исследования. Исследования генотоксичности воды с применением рыб и традесканции в качестве биоиндикаторов проведены в 4-х пунктах бассейна оз. Севан: юго-юго-запад от села Шоржа (40°28'33" с. ш. и 45°14'22" в. д.), 3,5 км к востоку от полуострова оз. Севан (40°33'46" с. ш. и 45°01'37" в. д.), в устьях рек Гаварагет (40°25'12" с. ш. и 45°09'53" в. д.) и Дзкнагет (40°36'55" с. ш. и 44°58'13" в. д.) (рис. 1А). Загрязнение воды вблизи полуострова оз. Севан и в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет оценивали также с применением раков.

Исследования генотоксичности почвы с применением ящериц рода *Darevskia* в качестве биоиндикаторов проводили в Сюникской области в заповеднике «Шикахох» (39°05'43" с. ш. и 46°28'25" в. д.) и г. Каджаране (39°09'04" с. ш. и 46°09'36" в. д.), в селе Зуар (НКР) (40°04'39" с. ш. и 46°13'47" в. д.), в Лорийской области в селе Привольном (41°00'27" с.ш. и 44°23'12" в.д.) и г. Ванадзоре (40°48'46" с.ш. и 44°29'18" в.д.) и в селе Лчач Гегаркуникской области (40°27'40" с.ш. и 45°03'54" в.д.). Исследования генотоксичности почвы с применением лесных мышей в качестве биоиндикаторов проведены в селе Зуар и г. Капане (Сюникская область) (39°12'04" с. ш. и 46°24'54" в. д.). Загрязнение почв в Шикахохе и Капане также оценивали с применением традесканции. Исследованные пункты представлены на рис. 1Б.

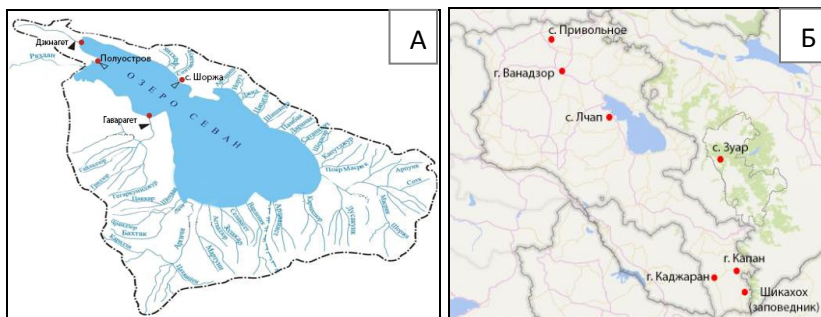


Рисунок 1. Географическое расположение пунктов исследования генотоксичности воды (А) и почвы (Б) на территории Армении и НКР.

Биоиндикаторные организмы. Группы серебряных карасей *Carassius auratus gibelio* включали от 5 до 7 животных. Образцы крови от каждой рыбы брали из сердца или хвостовой вены. Гепарин смешивали с кровью в соотношении 1:10. Гепаринизированную кровь разбавляли в фосфатном буфере (PBS) в соотношении 1:200. Группы речных раков *Astacus leptodactylus* включали по 6 животных. Гемолимфу раков брали из перикардального синуса и смешивали с антикоагулянтом (0,49 М NaCl, 30 мМ Na₂C₆H₅O₇, 10 мМ EDTA, pH 6.0) в соотношении 1:2. Раки и рыбы для экспериментальных исследований были любезно предоставлены Научным центром зоологии и гидроэкологии НАН РА.

Исследования проводили на двуполых ящерицах *Darevskia raddei* из заповедника «Шикахох» (9 самцов и 6 самок), Каджарана (6 самцов и 5 самок), Зуара (10 самцов и 7

самок) и села Лчап Гегаркуникской области (10 самцов и 8 самок). Также были изучены партеногенетические ящерицы *Darevskia unisexualis* (10 особей), *Darevskia armeniaca* из села Привольное Степанаванского района (10 особей) и Ванадзора (10 особей). Образцы крови от каждой ящерицы брались из хвостовой вены. Гепарин смешивали с кровью в соотношении 1:10. Гепаринизированная кровь разбавлялась в PBS в соотношении 1:80.

Были исследованы выборки малой лесной мыши *Apodemus uralensis* из села Зуар, НКР (5 самцов и 6 самок) и Капана (10 самцов и 1 самка). Образцы крови от каждой мыши брались из сердца и смешивались с гепарином в соотношении 1:10.

Метод ДНК-комет (гель-электрофорез единичных клеток) применяли для оценки повреждений ДНК в эритроцитах рыб, гемоцитах речных раков, лейкоцитах мышей и эритроцитах ящериц. В работе использовалась щелочная версия метода комет (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000) с небольшими модификациями.

На предметные стекла, покрытые слоем 1%-ного раствора агарозы, наносили 100 мкл смеси 0.5%-ого раствора легкоплавкой агарозы (LMA) с клетками исследованных животных. 10 мкл крови рыб и ящериц смешивали с 90 мкл LMA; 20 мкл гемолимфы раков и крови мышей смешивали с 80 мкл LMA. После затвердевания второго слоя препараты помещали в лизирующий раствор (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM Na₂EDTA, 2.5 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 10) на 1 ч при 4 °C.

Клетки крови ящериц и мышей подвергали лизису 24 ч. Длительность лизиса клеток крови рыб и гемоцитов раков составляла 1 ч. По окончании лизиса препараты погружали в щелочной буфер (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH > 13.0), для раскручивания цепей ДНК на 20 мин (кровь) или 40 мин (гемолимфа). Электрофорез проводили в течение 15 мин (кровь) или 20 мин (гемолимфа) при напряжении поля 25 В и силе тока 300 мА. После электрофореза препараты промывали в течение 15 мин нейтрализационным буфером (0.4 M Tris, pH 7.5) и окрашивали бромистым этидием (20 мкг/мл).

Автоматический анализ изображений комет проводили с применением коммерческой программы Comet Assay IV. Анализировали два параметра повреждений ДНК – % ДНК в хвосте кометы и момент хвоста Оливе.

С применением **тест-системы традесканции (клон 02)** оценивали частоту рецессивных (розовых) мутационных событий (РМС) в волосках тычиночных нитей (Трад-ВТН) (Ma et al., 1994a) и микроядер (МЯ) в тетрадах микроспор (Трад-МЯ) (Ma et al., 1994b; Misik et al., 2011). Растения обрабатывали водными пробами из исследуемых участков бассейна оз. Севан в течение 18 ч. При исследовании изучаемых почв, растения непосредственно высаживались в вазоны с почвами на весь период исследования (1 месяц). При проведении теста Трад-ВТН мутации анализировали после 7-дневного восстановительного периода. Для каждого варианта было проанализировано 18–22 тыс. тычиночных волосков. Оценивали число мутационных событий на 1000 волосков. При проведении теста Трад-МЯ молодые пыльники фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Препараты окрашивали раствором ацетокармина. Для каждого варианта анализировали по 3000 тетрад. Учитывали число микроядер на 100 тетрад.

Микроядерный тест у ящериц проводили согласно протоколу Poletta et al. (2008) с некоторыми модификациями. Гепаринизированная кровь разбавлялась в PBS в соотношении 1:80. На предметные стекла раскапывали 50 мкл крови, фиксировали метанолом в течение 10 мин, а затем окрашивали 10% раствором Гимза в течении 10 мин. Частоту клеток с микроядрами анализировали на 1000 эритроцитов у каждой особи.

Статистическая обработка данных проведена с применением теста множественного сравнения, теста Манн-Уитни, t-теста и корреляционного анализа Пирсона программы SPSS version 19 (SPSS, Inc., IBM Company, Chicago, IL) и STATGRAPHICS Centurion 16.2 (StatPoint Technologies, Inc. USA; Warrenton, VA).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Оценка генотоксичности воды бассейна оз. Севан с применением рыб в качестве биоиндикаторов

Генотоксичность воды из четырех участков бассейна оз. Севан: юго-юго-запад от села Шоржа, 3.5 км к востоку от полуострова оз. Севан, устья рек Гаварагет и Дзкнагет (рис. 1А) оценивали с применением серебрянного караса *C. auratus gibelio* в 2012 г. Уровни повреждений ДНК в эритроцитах *C. auratus gibelio*, полученные методом ДНК-комет, приведены на рис. 2А. Множественное сравнение трансформированных данных (\sqrt{x}) показывает, что у рыб, выловленных из устьев рек Гаварагет и Дзкнагет уровень повреждений ДНК достоверно выше, чем у рыб из участков около села Шоржа и вблизи полуострова оз. Севан.

3.2. Оценка генотоксичности воды бассейна оз. Севан с применением тест-системы традесканции

Генотоксичность воды из четырех участков бассейна оз. Севан: юго-юго-запад от села Шоржа, 3.5 км к востоку от полуострова оз. Севан, устья рек Гаварагет и Дзкнагет (рис. 1А) изучена с применением растительной тест-системы традесканции (клон 02) в 2012 г. Частота микроядер (МЯ) в тетрадах микроспор приведены на рис. 2Б. Различия в уровнях рецессивных (розовых) мутационных событий (РМС) в волосках тычиночных нитей традесканции (ВТН) не обнаружены. Результаты множественного сравнения показывают, что образцы воды из устьев рек Гаварагет и Дзкнагет (группа 2) индуцируют достоверно более высокий уровень микроядер, чем образцы воды около села Шоржа и вблизи полуострова оз. Севан (группа 1). Исследованные пункты не различаются по уровням генных мутаций.

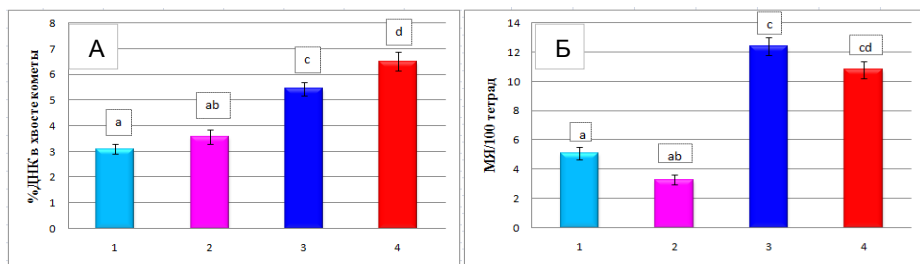


Рисунок 2. Уровни повреждений ДНК (значения представлены в виде средних квадратного корня % ДНК в хвосте комет и стандартной ошибки) у рыб *C. auratus gibelio* из четырех участков бассейна оз. Севан: (А) юго-юго-запад от села Шоржа (1), 3.5 км к востоку от полуострова оз. Севан (2) и устьев рек Гаварагет (3) и Дзкнагет (4) и (Б) уровни микроядер (МЯ) (значения представлены в виде средних и стандартной ошибки) у традесканции, обработанной пробами вод из тех же участков. Достоверные различия ($p < 0.001$) между данными отмечены разными буквами.

3.3. Оценка генотоксичности воды бассейна оз. Севан с применением речных раков в качестве биоиндикаторов.

Уровни повреждений ДНК в гемоцитах речных раков *A. leptodactylus*, обитающих вблизи полуострова оз. Севан и в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет (рис. 1А), полученные в 2012 г. методом ДНК-комет, приведены на рис. 3. Множественное сравнение трансформированных данных (\sqrt{x}) показывает, что уровень повреждений ДНК у раков из усть-

ев рек Гаварагет и Дзкнагет выше, чем у раков из полуострова оз.Севан. У раков из устья реки Гаварагет уровень повреждений ДНК выше, чем у раков из устья реки Дзкнагет.

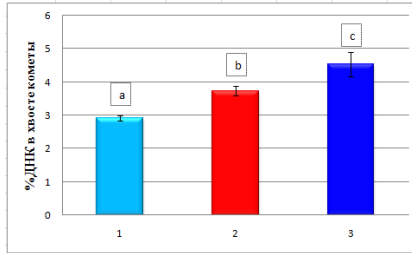


Рисунок 3. Уровни повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus* из трех участков бассейна оз. Севан: 3.5 км к востоку от полуострова оз. Севан (1), устья рек Дзкнагет (2) и Гаварагет (3). Значения представлены в виде средних квадратного корня % ДНК в хвосте комет и стандартной ошибки. Достоверные различия ($p < 0.01$) между данными отмечены разными буквами.

3.4. Корреляция уровней генетических повреждений у рыб, раков и традесканции с содержанием загрязнителей в воде

Уровни генетических повреждений у рыб, раков и традесканции отражают суммарное действие присутствующих в воде мутагенов. Для оценки индивидуального вклада отдельных загрязнителей в формирование генетических эффектов, анализировали корреляцию между уровнями повреждений ДНК у рыб и раков, а также микроядер и генных мутаций у традесканции и содержанием NO_3 , P_{total} , Si, Al, Fe, Mn, Cu и V в образцах воды (таблица 1). Химический анализ воды был проведен по стандартной методике (АРНА, 1998) в Центре мониторинга воздействия на окружающую среду Министерства охраны природы Республики Армения.

Выявлена достоверная положительная корреляция между повреждениями ДНК у рыб и уровнями NO_3 , P_{total} , Si, Al, Fe, Mn и Cu, а также между повреждениями ДНК у раков и содержанием NO_3 , P_{total} , Si, Mn, Cu и V. Уровни микроядер у традесканции достоверно положительно коррелируют с NO_3 , Si, Al, Fe, Mn и Cu. Уровни генных мутаций у традесканции не коррелируют ни с одним из загрязнителей. Корреляция уровней генетических повреждений с NO_3 , Si, Mn и Cu выявлена у всех биоиндикаторных организмов, следовательно именно эти загрязнители с наибольшей вероятностью ассоциированы с генотоксичностью воды. Кроме того, для рыб и традесканции показана корреляция генетических повреждений с содержанием Al и Fe, а для рыб и раков - с P_{total} . Обнаруженные различия в потенциальной чувствительности рыб, раков и традесканции к отдельным загрязнителям подтверждают необходимость совместного применения разных биоиндикаторных систем для эффективного генетического мониторинга.

Таблица 1.

Коэффициенты корреляции Пирсона (r) между уровнями повреждений ДНК у раков и рыб (% ДНК в хвосте) и уровнями микроядер (МЯ) и рецессивных мутационных событий (РМС) у традесканции и содержанием загрязнителей в воде.

Рыбы	% ДНК в хвосте	NO_3	P_{total}	Si	Al	Fe	Mn	Cu	V
		0.43*	0.66***	0.69***	0.71***	0.79***	0.87***	0.87***	0.17

Раки	кометы	0.67**	0.72***	0.75***	0.39	0.39	0.65***	0.71***	0.56*
Традескан- ция	МЯ	0.64**	0.40	0.83***	0.78**	0.92***	0.89***	0.65**	0.39
	PMS	-0.11	-0.05	-0.20	-0.29	-0.28	-0.29	-0.22	-0.02

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ - достоверная положительная корреляция

Результаты множественного сравнения уровней повреждений ДНК у рыб и раков и микроядер у традескании позволили выделить две группы участков в бассейне оз. Севан. Первая группа включает участки около села Шоржа и полуострова оз. Севан, во вторую группу входят устья рек Гаварагет и Дзкнагет. Экотоксикогенетические исследования и химический анализ показывают, что вода из устьев рек Гаварагет и Дзкнагет является более генотоксичной и более загрязненной по сравнению с участками около села Шоржа и полуострова оз. Севан. Таким образом, группировка участков оз. Севан по уровням повреждений ДНК у рыб, раков и традескании соответствует уровням их загрязненности.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что рыбы, раки и традескания являются чувствительными биоиндикаторами загрязнителей, распространенных в оз. Севан. Отсутствие различий между исследованными пунктами по уровням индуцированных у традескании генных мутаций подтверждает низкую чувствительность теста Трад-ВТН по сравнению с Трад-МЯ. Это связано с тем, что для индукции мутаций требуется локус-специфическое воздействие мутагена на конкретный ген, в то время как микроядра могут образовываться при повреждении любого локуса генома (Ohe et al., 2004).

В ряде работ показана эффективность применения рыб (Korjar et al., 2008; Cok et al., 2011; Akpoilih, 2013), раков (Schilderman et al., 1999; Klobučar et al., 2014) и традескании (Duan et al., 1999; Cesniene et al., 2007; Misik et al., 2014) в качестве биоиндикаторных организмов для оценки генотоксичности загрязнителей воды.

Полученные нами результаты о потенциальном вкладе NO_3 , P_{total} , Si, Al, Fe, Mn, Cu и V в формирование наблюдаемых генотоксических эффектов у рыб, раков и традескании подтверждаются данными литературы.

У рыб *O. niloticus*, обитающих вблизи дамбы Лукреция (Бразилия), показан повышенный уровень микроядер и ядерных аномалий на фоне превышающего допустимый уровень содержания Cu и Cr как в тканях рыб, так и в воде (Marcon et al., 2010). Повышенный уровень повреждений ДНК у рыб *B. barbuis* из реки Дунай (Сербия) ассоциируется с высоким содержанием в печени Cu и Mo (Sunjog et al., 2012). Cu вызывает повышение уровня микроядер у рыб *O. mykiss*. Возможным механизмом генотоксичности Cu может быть генерация повреждающих ДНК свободных радикалов кислорода (Bagdonas and Vosyliene, 2006). Генотоксичность Cu и Zn показана как при раздельном, так и при совместном действии на рыб *S. clarias* и *T. nilotica* с использованием микроядерного теста (Obiakor et al., 2010). Анализ городских сточных вод в Порту-Алегри (Бразилия) выявил корреляцию между уровнями повреждений ДНК у пресноводных планарий *G. schubarti* и содержанием в воде нитратов (NO_3) и нитритов (NO_2) (Pra et al., 2005). Повышение уровня повреждений ДНК в эритроцитах рыб *P. lineatus* при действии Al показано методом ДНК-комет (Galindo et al., 2010). Сточные воды тепловой электростанции, содержащие Fe и Ni в концентрациях, превышающих предельно допустимые, вызывают повышение уровней повреждений ДНК в клетках жабр и печени рыб *C. punctatus*. Также показано, что среди тяжелых металлов Fe обладает наиболее высокой биодоступностью и способностью к аккумуляции во всех органах *C. punctatus* (Javed et al., 2016). Возможным меха-

низмом токсичности железа может быть индукция повреждений ДНК за счет генерации свободных радикалов кислорода, которые могут стать причиной сайт-специфичных окислительных повреждений (Vuogi, 1995). Несмотря на широкую распространенность, роль Mn в пресноводных экосистемах пока мало изучена и знания о механизмах его токсического действия на рыб ограничены. В частности, показано, что Mn вызывает окислительный стресс у рыб *Carassius auratus* (Vieira et al., 2012). Генотоксичность воды реки Синос (Бразилия), содержащей Al, NO₃ и P_{total} показана методом ДНК-комет у рыб *H. luetkenii* (Scalon et al., 2013). С применением теста Трад-МЯ показано, что высокая генотоксичность воды оз. Хонгзе (Китай) может быть обусловлена повышенным содержанием P, Fe и NO₃ (Yang, 1999).

3.5. Оценка генотоксичности почв с применением двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* методом ДНК-комет

Для оценки генотоксичности почвы применяли ящериц рода *Darevskia* в качестве биоиндикаторов. В эритроцитах двуполых ящериц *D. raddei*, распространенных на территориях сел Зуар и Лчап, заповедника «Шикахох» и г. Каджарана, и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из села Привольное и г. Ванадзора в 2014 г. оценивали уровни повреждений ДНК методом ДНК-комет. Отсутствие различий между полами позволило объединить самок и самцов в общую группу.

Методом множественного сравнения трансформированных данных (\sqrt{x}) показано, что уровень повреждений ДНК у ящериц *D. raddei* из Каджарана достоверно выше, чем у ящериц из Зуара, Лчапа и Шикахоха. У ящериц из Лчапа и Шикахоха уровни повреждений ДНК не отличаются, но при этом они достоверно выше, чем у ящериц из Зуара (рис. 4).

У партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из Ванадзора уровень повреждений ДНК достоверно выше, чем у ящериц из села Привольное ($p < 0.05$) (таблица 2).

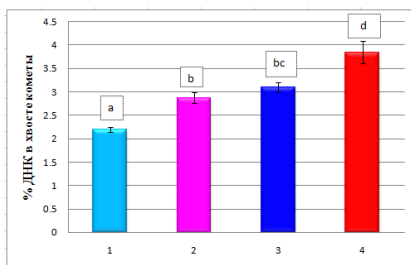


Рисунок 4. Уровни повреждений ДНК у двуполых ящериц *D. raddei*, обитающих на территориях Зуара (1), Лчапа (2), Шикахоха (3) и Каджарана (4). Значения представлены в виде средних квадратного корня % ДНК в хвосте кометы и стандартной ошибки. Достоверные различия ($p < 0.001$) между данными отмечены разными буквами.

Таблица 2.

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах партеногенетических ящериц *D. armeniaca*.

Местообитание	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
	Среднее ± SE	Медиана	Среднее ± SE	Медиана
Привольное	12.09±1.56	8.86	1.94±0.25	1.48
Ванадзор	20.54±2.21	17.64*	4.40±0.56	3.49*

* $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с селом Привольное

3.6. Оценка генотоксичности почв с применением двуполовых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* микроядерным тестом

У двуполовых ящериц *D. raddei* из села Лчап, заповедника «Шикахох» и г. Каджарана и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из села Привольное и г. Ванадзора в 2014 г. оценивали уровни микроядер в эритроцитах крови. Данные, полученные у самцов и самок объединены в связи с отсутствием различий между полами. Методом множественного сравнения показано, что уровни микроядер у двуполовых ящериц *D. raddei* в Каджаране достоверно выше, чем в Лчапе и Шикахохе (рис. 5), что совпадает с результатами, полученными методом ДНК-комет. Не выявлено достоверных различий в уровнях микроядер у партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из Ванадзора и села Привольное.

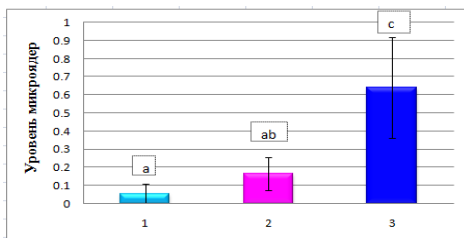


Рисунок 5. Уровни микроядер у двуполовых ящериц *D. raddei* из Лчапа (1), Шикахоха (2) и Каджарана (3). Значения представлены в виде среднего и стандартной ошибки. Достоверные различия ($p < 0.05$) между данными отмечены разными буквами.

3.7. Сравнение чувствительности двуполовых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. unisexualis* к генотоксическим загрязнителям почв

Уровни повреждений ДНК и микроядер у двуполовых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. unisexualis*, обитающих на территории села Лчап, по данным 2014 г. представлены в таблице 3. У *D. unisexualis* обнаружен более высокий уровень поврежденных ДНК, чем у *D. raddei*, различия в уровнях микроядер не выявлены.

Таблица 3.

Уровни повреждений ДНК и микроядер в эритроцитах двуполовых (*D. raddei*) и партеногенетических (*D. unisexualis*) ящериц, обитающих на территории Лчапа.

Вид	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе		Микроядра
	Среднее±SE	Медиана	Среднее±SE	Медиана	Среднее±SE
<i>D. raddei</i>	11.17±0.87	7.86	1.77±0.13	1.32	0.06±0.04
<i>D. unisexualis</i>	15.38±0.99	12.69*	2.75±0.17	2.30*	0.10±0.05

* $p < 0.01$ - достоверная разница по сравнению с двупольными ящерицами

3.8. Оценка генотоксичности почвы с применением мышей в качестве биоиндикаторов

Повреждения ДНК в лейкоцитах периферической крови малой лесной мыши *A. uralensis*, обитающей на территории Капана и Зуара, оценивали в 2014 г. методом ДНК-комет (таблица 4). Уровни повреждений ДНК у мышей из Капана и Зуара не различаются, несмотря на разную степень загрязнения этих территорий.

Таблица 4.

Уровни повреждений ДНК в лейкоцитах мышей *A. uralensis*.

Местообитание	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста кометы	
	Среднее ± SE	Медиана	Среднее ± SE	Медиана
Капан	6.64±0.22	2.84	0.99±0.03	0.43
Зуар	6.99±0.67	3.77	1.07±0.10	0.59

3.9. Оценка генотоксичности почвы с применением тест-системы традесканции

Уровень генотоксичности почвенных образцов с территорий заповедника «Шикахох» и Капана оценивали в 2014 г. с применением растительной тест-системы традесканции (клон 02) (таблица 5). Уровни микроядер у традесканции, выращенной в вазонах с почвенными образцами из Капана, достоверно выше, чем в растениях, выращенных в почве из Шикахоха ($p < 0.01$). Однако уровни мутаций в растениях, выращенных в обоих образцах почв, достоверно не различаются.

Таблица 5.

Уровни микроядер (МЯ) в тетрадах микроспор и рецессивных мутационных событий (РМС) в ВТН традесканции, выращенных в пробах почв из исследованных участков. Данные представлены в виде средних±SE.

Пробы почв	МЯ	РМС
Шикахох	3.50 ± 0.57	0.49 ± 0.69
Капан	6.30 ± 0.76**	0.85 ± 0.59

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ - достоверная разница по сравнению с Шикахохом

3.10. Корреляция уровней генетических повреждений у ящериц, мышей и традесканции с содержанием загрязнителей в почве

Генетические повреждения у ящериц, мышей и традесканции отражают суммарный эффект воздействия экотоксикантов окружающей среды. Для оценки индивидуального вклада отдельных загрязнителей почвы в формирование генетических эффектов проанализирована связь между генетическими параметрами и содержанием V, Co, Cu, Zn, As, Mo, Cd и Pb. Химический анализ почв был проведен по стандартной методике (АРНА, 1998) в рамках проекта "Examination of biodiversity in «Dundee Precious Metals Kapan» CJSK area" в компании "Bio Gama" LLC.

У двуполых ящериц *D. raddei* обнаружена положительная корреляционная связь между уровнями повреждений ДНК и микроядер и содержанием As, Cu, V, Mo и Pb. У партеногенетических ящериц *D. armeniaca* положительная корреляция показана только между повреждениями ДНК и содержанием Cu и Mo, при этом уровни микроядер ни с одним из загрязнителей не коррелируют. По данным корреляционного анализа можно предположить, что Cu и Mo с наибольшей вероятностью ассоциированы с генотоксическими эффектами у ящериц (таблица 6).

Частота микроядер у традесканции достоверно положительно коррелирует с содержанием в почве As, Cu, Zn, V, Mo, Pb и Cd. Корреляция с уровнем мутаций окраски волосков тычиночных нитей не выявлена (таблица 6).

Корреляционный анализ связи генетических параметров у мышей *A. uralensis* с концентрацией загрязнителей не проводился в связи с отсутствием различий в уровнях повреждений ДНК у животных, обитающих на территориях с различным уровнем загрязнения.

Таблица 6.

Коэффициенты корреляции Пирсона (r) между уровнями повреждений ДНК и микроядер (МЯ) у двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca*, уровнями микроядер (МЯ) в тетрадах микроспор и рецессивных мутационных событий (РМС) в ВТН традесканции и содержанием загрязнителей в почве.

Загрязнители	<i>D. raddei</i>	<i>D. armeniaca</i>	<i>D. raddei</i>	<i>D. armeniaca</i>	Традесканция	
	% ДНК в хвосте кометы		МЯ		МЯ	РМС
V	0.80***	-0.25	0.63*	0.02	0.91*	0.65
Co	-0.69	-0.09	-0.21	-0.11	-0.63	-0.05
Cu	0.76***	0.68**	0.59*	-0.009	0.92*	0.66
Zn	-0.43	-0.09	-0.51	-0.09	0.93**	0.62
As	0.76***	-0.02	0.62*	-0.02	0.94**	0.61
Mo	0.77***	0.78***	0.61*	0.14	0.94**	0.68
Cd	-0.08	-0.75	-0.44	-0.15	0.93**	0.57
Pb	0.62**	-0.74	0.31	-0.14	0.93**	0.63

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ - достоверная положительная корреляция

Данные об уровнях повреждений ДНК и микроядер у двуполых ящериц *D. raddei* позволили выделить участки с относительно высоким (Каджаран) (Gevorgyan et al., 2015) и относительно низким (Зуар, Лчач и Шикахох) уровнем генотоксичности почв. Данные по генотоксичности согласуются с данными по химическому загрязнению, в частности в почве Каджарана повышено содержание V, Cu, As, Mo и Pb по сравнению с Зуаром, Лчачом и Шикахохом.

У партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из Ванадзора уровень повреждений ДНК выше, чем у ящериц из села Привольное, что согласуется с повышенным содержанием в почве Ванадзора Cu и Mo. Отсутствие различий в уровнях микроядер между этими двумя группами животных может быть обусловлено более высокой чувствительностью метода ДНК-комет, позволяющего регистрировать первичные повреждения ДНК, часть которых репарируется и не наследуется дочерними клетками и, следовательно, не может быть обнаружена микроядерным тестом (Сорочинская и Михайленко, 2008). Наши данные о более высокой чувствительности метода ДНК-комет по сравнению с микроядерным тестом в экотоксикогенетических исследованиях подтверждаются данными литературы (Jha, 2008).

Таким образом группировка изученных территорий на основе генотоксичности по параметрам повреждений ДНК и хромосом у ящериц в целом соответствует уровням их загрязненности. Следовательно, ящерицы рода *Darevskia* являются чувствительными биоиндикаторами к суммарному действию загрязнителей почвы изученных территорий. Известно, что ящерицы, будучи холоднокровными животными, чувствительны к загрязнению среды за счет медленного метаболизма и репарации повреждений ДНК (Schaumburg et al., 2012). Эффективность применения ящериц в качестве биоиндикаторных организмов для оценки генотоксического влияния загрязнения среды также показана в работах Caprigione et al. (2011); Schaumburg et al. (2012; 2015), Дробот и Ремизова (2012) и Stepanyan et al. (2015).

Вблизи села Лчач ареалы обитания двуполых и партеногенетических ящериц рода *Darevskia* пересекаются, что позволило сравнить их чувствительность к локальным загрязнителям. Выявлено, что партеногенетические ящерицы *D. unisexualis* более чувстви-

тельны к загрязнителям среды, чем двуполые ящерицы *D. raddei*. У особой генетически неоднородных популяций чувствительность к загрязнителям среды может различаться. Партогенетические позвоночные образуют линии генетически идентичных животных и поэтому являются уникальными модельными организмами для экологических, эволюционных и молекулярно-генетических исследований (Бадаева, 2008).

Полученные результаты подтверждают возможность применения распространенных в Армении скальных ящериц рода *Darevskia*, в том числе партогенетических видов, в качестве биоиндикаторов генотоксического воздействия загрязнителей среды.

Несмотря на повышенное содержание V, Cu, Zn, As, Mo, Cd и Pb в почве Капана по сравнению с Зуаром, уровни повреждений ДНК у мышей, обитающих на этих территориях не различаются. Это может быть обусловлено активными адаптативными процессами, имеющими место в популяциях млекопитающих, хронически подвергающимся действию средовых загрязнителей (Sánchez-Chardi et al., 2008). Уровни повреждений ДНК, близкие к полученным нами данным, были обнаружены у алжирских мышей *Mus spretus*, обитающих в Испании на территориях с повышенной концентрацией As, Cu и Zn (Mateos, 2008). Таким образом, несмотря на данные об эффективном применении мелких млекопитающих в качестве биоиндикаторов (Sánchez-Chardi et al., 2007a, b; Ieradi et al., 1996; 1998, Talmage and Walton, 1991), в наших исследованиях мыши *A. uralensis* не проявили чувствительность к генотоксикантам среды их обитания.

Применение тест-системы традесканции позволило выявить различия в частоте встречаемости микроядер у растений, выращенных в почвах Капана и Шикахоха с разным уровнем загрязненности. Отсутствие различий в уровнях мутаций у этих же растений согласуется с данными литературы о том, что анализ микроядер является более чувствительным критерием оценки генотоксичности, чем оценка мутационных событий (Knasmüller et al., 1998, Čėsniēnē et al., 2007).

Таким образом, наши результаты показали, что ящерицы рода *Darevskia* и традесканция являются чувствительными биоиндикаторами локального загрязнения на исследованных территориях Армении. Однако мыши *A. uralensis* оказались не чувствительны к воздействию распространенных в местах их обитания загрязнителей.

При анализе генотоксичности почв выявлена корреляция генетических повреждений у ящериц с содержанием As, Cu, V, Mo и Pb. В немногочисленных публикациях по применению ящериц для биоиндикации, основанной на генетических параметрах, анализ связи с химическим составом загрязнителей среды обитания в основном отсутствует, за исключением данных Sterapyan et al. (2015) о повышенном уровне повреждений ДНК у ящериц *Darevskia*, обитающих в г. Алаверды (Армения), загрязненном Cu, Pb, As и Zn.

Однако наши результаты по корреляции с отдельными загрязнителями согласуются с данными, полученными на других наземных животных-биоиндикаторах. У озёрной лягушки *Pelophylax ridibundus*, жуков *Rhagonycha fulva* и *Stictoleptura tonsa* и улиток *Helicella derbentina* в г. Алаверды, загрязненном Cu, Pb, As и Zn, повышен уровень повреждений ДНК (Harutyunyan et al., 2014).

Повреждения ДНК повышены у мышей *Mus spretus* в Испании на территориях, загрязненных As, Cu и Zn (Mateos, 2008), а также у мышей *Apodemus sylvaticus*, распространенных на территориях вблизи завода цветных металлов в Антверпене (Бельгия), загрязненных смесью Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb и Zn (Scheirs et al., 2006). В лабораторных экспериментах показано, что регулярный прием пищи с повышенным содержанием Cd и Pb приводит к небольшим, но стойким изменениям в экспрессии генов и генотоксическим эффектам в клетках желудочно-кишечного тракта у мышей (Breton et al., 2013).

У землеройки *Crocidura russula*, обитающей вблизи рудников (Португалия), показана положительная корреляция уровня микроядер с содержанием Fe, Pb и Cd и (Sanchez-Chardi et al., 2008).

Scheirs et al. (2006) не обнаружили связи между содержанием отдельных загрязнителей в печени и почках мышей *Apodemus sylvaticus* и повреждениями ДНК для отдельных животных, что свидетельствует о сложностях оценки индивидуального генетического риска в природных условиях и подтверждает преимущества оценки популяционного риска суммарного эффекта загрязнителей.

Результаты корреляционного анализа, полученные с применением традесканции, согласуются с данным Steinkellner et al. (1998) о том, что As, Cd, Pb и Zn вызывают достоверное повышение частоты микроядер у традесканции (Steinkellner et al., 1998). Статистически достоверная корреляция показана между частотой микроядер у традесканции и содержанием Zn, Mo и V в почве (Cesniene et al., 2007).

Несмотря на достоверную корреляционную зависимость содержания определенных загрязнителей воды и почвы с генетическими повреждениями у биоиндикаторных организмов, ни один из них невозможно однозначно считать ответственным на наблюдаемые генетические эффекты. Множество других ксенобиотиков окружающей среды также определяют формирование наблюдаемых повреждений ДНК и хромосом (Sanchez-Chardi et al., 2008). Водные и наземные организмы, как правило, подвергаются воздействию сложной смеси средовых загрязнителей. При этом суммарные генотоксические эффекты могут существенно отличаться от эффектов отдельных загрязнителей в результате синергического и антагонистического взаимодействия отдельных токсикантов (Duan et al., 1999; Tapisso et al., 2009). Химические элементы, сами по себе не мутагенные, при взаимодействии могут образовывать соединения, оказывающие генотоксическое воздействие. Таким образом, очень важно оценивать генотоксичность загрязнения окружающей среды в целом, а не каждого компонента по отдельности (Sasaki et al., 1997). В связи с этим оптимальным считается применение методов генетического мониторинга, позволяющих определять суммарный мутагенный эффект, обусловленный действием сложнейших комбинаций мутагенов и их модификаторов. Наши результаты характеризуют генотоксичность действия смеси загрязнителей среды на биоиндикаторные организмы.

В работе была изучена эффективность применения рыб, раков и традесканции для выявления генотоксического потенциала загрязнителей воды, а также ящериц, мышей и традесканции для выявления генотоксического потенциала загрязнителей почвы. Все биоиндикаторы оказались чувствительными к локальным загрязнителям, за исключением мышей, уровень повреждений ДНК у которых на относительно чистых и загрязненных территориях не отличался. Данные, полученные на животных и растительных тест-системах, в основном согласуются друг с другом, таким образом их применение в генетическом мониторинге окружающей среды в Армении может быть ценным дополнением к химическому анализу состава загрязнителей.

ВЫВОДЫ

Изучение суммарного генотоксического эффекта загрязнения воды бассейна оз. Севан и почвы в ряде регионов Армении на основе анализа повреждений ДНК и хромосом методами ДНК-комет и микроядер у животных биоиндикаторных организмов (рыб, раков, ящериц и мышей), а также соматических мутаций и микроядер у традесканции позволяет сделать следующие выводы:

1. Генотоксичность загрязнителей воды бассейна оз. Севан, выявленная с использованием рыб, раков и традескации в качестве тест-объектов, положительно коррелирует с содержанием в воде NO_3 , Si, Mn и Cu.
2. Генотоксичность загрязнителей почвы в Армении, выявленная с использованием двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* в качестве тест-объектов, положительно коррелирует с повышенным содержанием в почве Cu и Mo.
3. На основе уровней повреждений ДНК, показано, что партеногенетические ящерицы *D. unisexualis* являются более чувствительными тест-объектами для оценки загрязнителей почв по сравнению с двуполыми ящерицами *D. raddei*.
4. При использовании мышей, в качестве тест-объектов, не выявлены различия в уровнях повреждений ДНК в популяциях, обитающих в ареалах с различной степенью генотоксического загрязнения.
5. У растительного тест-объекта традесканции микроядерный тест является более чувствительным биомаркером генотоксичности почвы, чем генные мутации. Уровни микроядер у традесканции положительно коррелируют с содержанием в почве As, Cu, Zn, V, Mo, Pb и Cd.
6. Показан более высокий уровень повреждений ДНК и хромосом у организмов, обитающих в более загрязнённых водных и почвенных экосистемах Армении. Все использованные тест-объекты, за исключением мышей, проявили чувствительность к генотоксикантам среды их обитания. Определены конкретные загрязнители, ассоциированные с генотоксическими эффектами. В целом, на основе генетического тестирования выбраны растительные и животные тест-объекты, наиболее адекватные для генетического мониторинга различных экосистем Армении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Simonyan A.**, Hovhannisyan G., Gabrielyan B., Minasyan S., Aroutiounian R. Investigation of relationship between DNA damage in fish and chemical contamination of water bodies in Armenia. Proceedings of Young Scientists International Conference "Perspectives for development of molecular and cellular biology -3, Yerevan, September 26-29, 2012; 185-189.

2. Оганесян Г. Г., **Симонян А. Э.**, Габриелян Б. К., Минасян С. Г., Арутюнян Р. М. Оценка поврежденных ДНК в эритроцитах рыб из разных водоемов Армении методом ДНК-комет. Биолог. журн. Армении. 2012; 64 (4): 64-70.
3. **Simonyan A.E.**, Harutyunyan T.A., Gevorgyan A.L., Tadevosyan E.H, Gabrielyan B. K., Badalyan N.S., R.M. Aroutiounian. Levels of DNA damage in crayfish hemocytes. Proc. of the Yerevan State University. Chemistry and Biology. 2014; 1: 58-60.
4. Агаджанян Э.А., Авалян Р.Э., Атоянц А.Л., Геворкян А.Л., Минасян С.Г., **Симонян А.Э.**, Арутюнян Р.М. Скрининг генотоксических эффектов вод рек бассейна оз.Севан с помощью растительной тест-системы – традесканции. Биолог. журн. Армении. 2014; 66 (1): 31-35.
5. **Simonyan, A. E.** Evaluation of soil genotoxicity in Karvachar and Kapan using the comet assay in ural field mouse (*Apodemus uralensis*). *Biolog. Journal of Armenia*. 2015;67 (3): 12-15.
6. **Симонян А.Э.**, Геворкян А.Л., Минасян С.Г., Саргсян А.А., Аракелян М.С. Анализ повреждений ДНК у ящериц *D.Raddei*, обитающих в зонах с различным уровнем загрязнения почв, методом ДНК-комет. Биолог. журн. Армении 2015; 67 (4): 65-67.
7. Агаджанян Э.А., Авалян Р.Э., Атоянц А.Л., **Симонян А.Э.**, Арутюнян Р.М. Изучение генетических эффектов в природных экосистемах с применением растительного тест-объекта. “Труды по прикладной ботанике, генетики и селекции”, ВИР, Санкт-Петербург, 2015; 176(3):346-356.
8. Aroutiounian R.M., Novhannisyanyan G.G., **Simonyan A.E.** Ecogenetic studies in Armenia. IV International conference, “Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and Evolution”, St. Petersburg 2-6 June 2015; p. 103.
9. Aghajanyan E.A., **Simonian A.E.**, Avalyan R.E., Atoyants A.L. Assessment of clastogenic effects in the ecosystems of Armenia using model test-object. Proceedings of III (XI) International Botanical Conference of Young Scientists in Saint-Petersburg 4 – 9 October 2015; p. 151.
10. **Симонян А.Э.**, Оганесян Г.Г., Габриелян Б.К., Минасян С.Г., Арутюнян Т.А., Геворкян А.Л., Арутюнян Р.М. Экогенотоксикологическое исследование бассейна озера Севан с применением речных раков (*Astacus leptodactylus*) и традесканции. Всероссийская научная конференция “Медико-экологические и социально-экономические проблемы прибрежных регионов”, Ростов–на-Дону, 15-18 декабря 2015; 168-176.
11. Авалян Р.Э., Агаджанян Э.А., Атоянц А.Л., Геворкян А.Л., **Симонян А.Э.** Биотестирование почв Сюникского марза Армении с применением модельного тест-объекта клона 02 Традесканции в системе почва-растение. Биолог. журн. Армении 2016; 68 (1): 30-34.
12. **Simonyan A.**, Gabrielyan B, Minasyan S, Novhannisyanyan G, Aroutiounian R. Genotoxicity of Water Contaminants from the Basin of Lake Sevan, Armenia Evaluated by the Comet Assay in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) and Tradescantia Bioassays. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2016; 96(3):309-313.

ՄԻՄՈՆՅԱՆ ԱՆՆԱ ԷՂԻԿԻ

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՈՐՈՇ ՏԱՐԱԾՔՆԵՐԻ ԳԵՆԱԹՈՒՆԱՅԻՆ
ԳՈՐԾՈՆՆԵՐՈՎ ԱՂՏՈՏՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ
ՏԱՐԲԵՐ ԿԵՆՍԱՑՈՒՑԻՉՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ**

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ կենսացուցիչներ, հողի և ջրի գենաթունայնություն, խեցգետին, ձուկ, երկսեռ և կուսածին մողեսներ, անտառային մուկ, տրադեսկանցիա (կլոն 02), ԴՆԹ-կոմետ մեթոդ, միկրոկորիզային թեստ

Ատենախոսական աշխատանքը նվիրված է Հայաստանի ջրի և հողի գենաթունային աղտոտիչների գնահատման համար առավել նպատակահարմար բուսական և կենդանական թեստ-օբյեկտների և կենսամարկերների ընտրությանը:

Սևանա լճի ավազանի տարբեր կետերի **ջրի գենաթունայնությունը** որոշվել է այդտեղ բնակվող ձկների էրիթրոցիտներում և խեցգետինների հեմոցիտներում ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակի գնահատմամբ՝ ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով: Այդ նույն տարածքների ջրերի նմուշների գենաթունայնությունը որոշվել է նաև բուսական թեստ-օբյեկտ տրադեսկանցիայի (*կլոն 02*) կիրառմամբ՝ գնահատելով ռեցեսիվ մուտացիաները առէջաթելերի մագիկներում և միկրոկորիզները (ՄԿ) միկրոսպորների տետրադներում:

Հողի գենաթունայնությունը որոշելու համար գնահատվել են ԴՆԹ-ի և քրոմոսոմների վնասվածքները երկսեռ և կուսածին մողեսների էրիթրոցիտներում՝ ԴՆԹ-կոմետ և միկրոկորիզային մեթոդներով, ԴՆԹ-ի վնասվածքները անտառային մկան լեյկոցիտներում՝ ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով, ինչպես նաև մուտացիաները և միկրոկորիզները տրադեսկանցիայի մոտ:

Ջրի գենաթունայնության գնահատումը ձկների, խեցգետինների և տրադեսկանցիայի կիրառմամբ: Ջրի գենաթունայնությունը որոշվել է Սևանա լճի ավազանի չորս կետերում՝ Շորժա գյուղից դեպի հարավ-հարավ արևմուտք, Սևանա լճի թերակղզուց 3.5 կմ դեպի արևելք, Գավառագետի և Ձկնագետի գետաբերաններում: Առավել աղտոտված Գավառագետի և Ձկնագետի գետաբերաններից *C. auratus gibelio* ձկների և *A. leptodactylus* խեցգետինների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների, ինչպես նաև նույն տարածքներից ջրերի նմուշներով մշակված տրադեսկանցիայի մոտ ՄԿ-ի մակարդակները հավաստիորեն ավելի բարձր են համեմատած առավել մաքուր Սևանա լճի Շորժայի և Թերակղզու տարածքների հետ: Հայտնաբերվել է հավաստի դրական կորելյացիա կիրառված բոլոր կենսացուցիչների մոտ ԴՆԹ-ի և քրոմոսոմների վնասվածքների ու ջրում պարունակվող NO_3 , Si, Mn և Cu-ի միջև:

Հողի գենաթունայնության գնահատումը՝ մողեսների կիրառմամբ: Ջուար (ԼՂՀ) և Լճափ գյուղերի, «Շիկահող» պետական արգելոցի և Քաջարան քաղաքի տարածքներից հողի գենաթունայնությունը որոշվել է *D. raddei* երկսեռ մողեսների կիրառմամբ: Ցույց է տրվել, որ առավել աղտոտված Քաջարանի տարածքից նմուշառված մողեսների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը հավաստիորեն բարձր է առավել մաքուր Ջուարի, Լճափի և «Շիկահող»-ի համեմատ: Վանաձոր քաղաքից նմուշառված *D. armeniaca* կուսածին մողեսների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը հավաստիորեն բարձր է Պրիվոլնոյե գյուղի մողեսների հետ համեմատած: Հայտնաբերվել է հավաստի դրական կորելյացիա *D. raddei* մողեսների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների և ՄԿ-ի մակարդակի և հողում

պարունակվող As, Cu, V և Mo-ի, ինչպես նաև *D. armeniaca* մոդեսների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների և հոդում պարունակվող Cu և Mo-ի միջև:

Լճափ գյուղից նմուշառված երկսեռ *D. raddei* և կուսածին *D. unisexualis* մոդեսների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակների համաձայն՝ կուսածին մոդեսներն ավելի զգայուն են շրջակա միջավայրի գենաթունային աղտոտվածության նկատմամբ, քան երկսեռ մոդեսները:

Չողի գենաթունայնության գնահատումը՝ անտառային մկան կիրառմամբ:

Ձուար գյուղի և Կապան քաղաքի հողի գենաթունայնության գնահատումն իրականացվել է տեղաբնակ *A. uralensis* անտառային մկան կիրառմամբ: Չնայած Ձուարի համեմատ Կապանի հողի ավելի բարձր աղտոտվածությանը՝ նշված տարածքներից նմուշառված մկների մոտ ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակների միջև հավաստի տարբերություն չի հայտնաբերվել:

Չողի գենաթունայնության գնահատումը՝ տրադեսկանցիայի կիրառմամբ:

Տրադեսկանցիայի մոտ ՄԿ թեստի կիրառմամբ ցույց է տրվել, որ Կապանում հողի գենաթունայնությունը ավելի բարձր է <<Շիկահող>> պետական արգելոցի համեմատ:

Հայտնաբերվել է հավաստի դրական կորելյացիա տրադեսկանցիայի մոտ ՄԿ-ի հաճախականության և հոդում պարունակվող As, Cu, Zn, V, Mo, Pb և Cd-ի միջև: Սակայն նույն բույսերի մոտ, ըստ մուտացիաների մակարդակի, Կապանի և <<Շիկահող>>-ի միջև հավաստի տարբերություն չի դիտվել:

Ստացված տվյալները վկայում են, որ Հայաստանի առավել աղտոտված ջրային և ցամաքային էկոհամակարգերում բնակվող օրգանիզմների մոտ դիտվել են ԴՆԹ-ի և քրոմոսոմների վնասվածքների՝ ավելի բարձր մակարդակներ: Կիրառված բոլոր կենսացուցիչ օրգանիզմները, բացառությամբ մկների, դրսևորել են բարձր զգայունություն իրենց բնակության միջավայրի գենաթունայնության նկատմամբ: Կորելյացիոն վերլուծության միջոցով հայտնաբերվել են առանձին աղտոտիչներ, որոնք կարող են հանդիսանալ գենետիկական էֆեկտների առաջացման հնարավոր պատճառ: Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս առաջարկելու կենդանական և բուսական կենսացուցիչների համատեղ կիրառում Հայաստանում՝ գենաթունային գործոններով շրջակա միջավայրի աղտոտվածության մշտադիտարկման համար:

**ASSESSMENT OF POLLUTION WITH GENOTOXIC FACTORS OF
SOME REGIONS OF ARMENIA WITH APPLICATION
OF VARIOUS BIOINDICATORS**

SUMMARY

Key words: bioindicators, genotoxicity of soil and water, crayfish, fish, bisexual and parthenogenetic lizards, wild mouse, *Tradescantia* (clone 02), comet assay, micronuclei test

The aim of our research was the selection on the basis of testing an adequate plant and animal test-objects and biomarkers for assessment of water and soil genotoxic pollution in Armenia.

Genotoxicity of water in the basin of Lake Sevan was evaluated by the comet assay in fish and crayfish and with application of *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) and *Tradescantia* stamen hair mutation (Trad-SHM) assays. **Soil genotoxicity** was evaluated using comet assay and micronuclei (MN) test in bisexual and parthenogenetic lizards, comet assay in field mice and with application of Trad-MCN and Trad-SHM assays.

Water genotoxicity assessment with application of fish, crayfish and *Tradescantia*. Water genotoxicity was evaluated in four sites of Lake Sevan basin: south–southwest of the village Shorzha, 3.5 km to the east of the Peninsula of Lake Sevan and in estuaries of Gavaraget and Dzknaget Rivers. The levels of DNA damage in erythrocytes of fish *C. auratus gibelio* and hemocytes of crayfish *A. leptodactylus* from more polluted estuaries of Gavaraget and Dzknaget Rivers and MN frequency in *Tradescantia*, treated with **water** samples, were significantly higher compared to results, obtained from less polluted areas near Shorzha and Peninsula of Lake Sevan. The significant positive correlation between DNA and chromosome damage and content of NO₃, Si, Mn and Cu in water was revealed for all applied bioindicators.

Soil genotoxicity assessment with application of lizards. Genotoxicity of soil near the villages Zuar (NKR) and Lchap, nature reserve “Shikahogh” and Kajaran town was evaluated using bisexual lizard *D. raddei*. It was shown, that the levels of DNA damage in erythrocytes of lizards *D. raddei* from the more polluted Kajaran were significantly higher compared with lizards from the less polluted Zuar, Lchap and “Shikahogh”. The level of DNA damage in parthenogenetic lizard *D. armeniaca* caught in Vanadzor town was significantly higher compared with lizards from village Privolnoe. The significant positive correlation was revealed between DNA damage and MN frequency in lizards *D. raddei* and content of As, Cu, V and Mo in soil, and between DNA damage in lizards *D. armeniaca* and content of Cu and Mo in soil. Based on the evaluation of DNA damage in bisexual *D. raddei* and parthenogenetic *D. unisexualis* lizards from Lchap village, it was shown that parthenogenetic species are more sensitive toward environmental pollutions than the bisexual species.

Soil genotoxicity assessment with application of wild mouse. Evaluation of soil genotoxicity in Kapan town and Zuar was performed using local field mouse *A. uralensis*. Despite the higher level of contamination of the soil in Kapan compared with Zuar, no difference between levels of DNA damage in leukocytes of mice living in these areas was detected.

Soil genotoxicity assessment with application of Tradescantia. Higher level of soil genotoxicity in Kapan compared with nature reserve “Shikahogh” demonstrated using Trad-MCN assay. The significant correlation between MN frequency in Tradescantia and content of As, Cu, Zn, V, Mo, Pb and Cd in soils was revealed. However, the levels of Trad-SHM in the same plants were not differed.

The results obtained suggest that organisms living in more polluted water and soil ecosystems of Armenia show higher levels of DNA and chromosome damage. All applied bioindicators with the exception of mice were sensitive toward mixture of genotoxic pollutants of their environment. Specific pollutants that probably determine the formation of genotoxic effects were identified using correlation analysis. The results obtained permit to recommend combined application of plant and animal bioindicators for monitoring of environmental genotoxic contaminants in Armenia.