

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**СИМОНЯН АННА ЭДИКОВНА**

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

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

**Научный руководитель**

**Доктор биологических наук,  
доцент Г.Г. Оганесян**

**ЕРЕВАН – 2016**

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	10
1.1. Экотоксикогенетические исследования загрязнителей окружающей среды .....	10
1.2. Метод ДНК-комет (гель-электрофорез единичных клеток).....	13
1.3. Применение метода ДНК-комет в экотоксикогенетике.....	17
1.4. Микроядерный тест.....	19
1.5. Применение микроядерного теста в экотоксикогенетике.....	21
1.6. Рыбы, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды.....	23
1.7. Раки, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды.....	26
1.8. Ящерицы, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды.....	18
1.9. Мыши, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды.....	29
1.10. Традесканция, как биоиндикатор генотоксического загрязнения окружающей среды.....	32
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	35
2.1. Пункты исследования.....	35
2.2. Биоиндикаторные организмы.....	36
2.3. Метод ДНК-комет.....	38
2.4. Микроядерный тест.....	39
2.5. Тест-система традесканции.....	39
2.6. Статистическая обработка данных.....	40
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	41
3.1. Загрязнение воды бассейна оз. Севан.....	41
3.2. Оценка генотоксичности воды бассейна оз. Севан с применением рыб в качестве биоиндикаторов.....	42
3.3. Оценка генотоксичности воды бассейна оз. Севан с применением тест-системы традесканции.....	43
3.4. Оценка генотоксичности воды бассейна оз. Севан с применением речных раков в качестве биоиндикаторов.....	50

3.5. Корреляция уровней генетических повреждений у рыб, раков и традесканции с содержанием загрязнителей в воде.....	54
3.6. Загрязнение почв в исследованных пунктах на территории Армении.....	57
3.7. Оценка генотоксичности почв с применением двуполых ящериц <i>D. raddei</i> и партеногенетических ящериц <i>D. armeniaca</i> методом ДНК-комет.....	58
3.8. Оценка генотоксичности почв с применением двуполых ящериц <i>D. raddei</i> и партеногенетических ящериц <i>D. armeniaca</i> микроядерным тестом.....	68
3.9. Сравнение чувствительности двуполых ящериц <i>D. raddei</i> и партеногенетических ящериц <i>D. unisexualis</i> к генотоксическим загрязнителям почв.....	70
3.10. Оценка генотоксичности почвы с применением мышей в качестве биоиндикаторов...	71
3.11. Оценка генотоксичности почвы с применением тест-системы традесканции.....	75
3.12. Корреляция уровней генетических повреждений у ящериц, мышей и традесканции с содержанием загрязнителей в почве.....	76
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	82
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	84
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	86

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МЯ-микроядро

ВТН-волоски тычиночных нитей традесканции

РМС-рецессивные мутационные события

## ВВЕДЕНИЕ

**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., 2012). 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., 2012). 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 (Tarpisso 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 двуполыми 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Экотоксикогенетические исследования загрязнителей окружающей среды

**Экотоксикогенетика** – дисциплина, изучающая взаимодействие между генетическим материалом и факторами антропогенного происхождения, повреждающими ДНК (Shugart and Theodorakis, 1994). Ксенобиотики трансформируются в экосистеме, образуя новые соединения, распространяются по трофическим цепям, и впоследствии могут индуцировать генетические повреждения у растений и животных, а также у человека. Чрезвычайный рост в химической промышленности во второй половине XX века привел к появлению многочисленных новых химических соединений, большая часть из которых вызывает различные биологические эффекты (de Lapuente et al., 2015). Генетическую опасность могут представлять как чужеродные для организма вещества, так и жизненно необходимые соединения, поступающие в организм в избыточных количествах.

**Целями** экотоксикогенетических исследований являются:

- 1) изучение влияния ксенобиотиков на диких животных и растениях и последствий этого влияния на уровне индивида, популяции, вида и экосистемы,
- 2) определение генетических эффектов загрязнения на ранних стадиях, до того, как загрязнители среды смогут повлиять на экосистемы и здоровье человека.

Несмотря на существенное усовершенствование методов определения загрязняющих веществ в почве, воде, донных отложениях и биологических образцах, тем не менее многие опасные соединения присутствуют в окружающей среде в концентрациях за пределом возможности их обнаружения (Jha, 2008). **Химический анализ загрязнителей** окружающей среде в абиотических образцах или в биологических пробах не позволяет оценивать возможные биологические или экологические эффекты этих соединений. Кроме того, загрязняющие вещества в окружающей среде, в том числе генотоксические агенты, присутствуют в виде сложных смесей, эффект совместного действия которых существенно отличается от эффектов отдельных соединений. В связи с этим необходимо оценивать влияние загрязнителей среды на биологические системы, являющиеся мишенью действия токсикантов.

За последние несколько десятилетий быстрый прогресс был достигнут в определении влияния факторов окружающей среды на индукцию генетических повреждений в популяциях человека, в то время как относительно ограниченный прогресс был замечен в определении влияния этих факторов на популяции диких видов. Одной из причин ограниченного прогресса

са в области экотоксикогенетики являются сложности осуществления мониторинга в диких популяциях, в частности с применением новых молекулярных методов (Wassom et al., 1996). Исследования генетических повреждений в природных популяциях, которые осуществляются последние несколько десятилетий (Wurgler et al., 1992, Anderson et al., 1994, Bickham et al., 2000, Jha, 1998; 2004) способствовали существенному развитию экотоксикогенетики.

Основной задачей **биоиндикации** является разработка методов, которые отражают уровень антропогенных действия на живые организмы и их сообщества. Применение биоиндикаторных организмов позволяет оценивать комплексное загрязнение среды и определять ранние нарушения у организмов, обитающих в данной среде (Ляшенко, 2012).

Различаются "**биомаркеры воздействия**" и "**биомаркеры эффекта**". **Биомаркеры воздействия** позволяют количественно оценивать воздействие генотоксикантов. Биомаркеры эффектов позволяют оценивать биологические реакции на действие загрязнителей среды, в частности ранние эффекты например, генные мутации, хромосомные aberrации, микроядра, сестринские хроматидные обмены и повреждения ДНК (Shugart and Theodorakis, 1998).

Тонкими и точными методами биодиагностики являются **генетические методы**. Генетические методы позволяют анализировать генетические изменения, возникающие вследствие неблагоприятных внешних воздействий. Появление таких изменений характеризует мутагенную активность среды. Разнообразие методов биоиндикации говорит об их несовершенстве (Якунина, 2009).

Экогенотоксикологические исследования позволяют оценивать влияние антропогенных ксенобиотиков на ДНК, которая благодаря своей целостности обеспечивает функциональность, изменчивость и адаптацию природных популяций, сохранение биоразнообразия (Angeletti and Carere, 2014).

Применение **биоиндикаторных организмов** для оценки загрязнения окружающей среды позволяет получать информацию о последствиях действия загрязнителей окружающей среды на организмы и оценивать суммарный мутагенный эффект генотоксикантов (Jha, 2000). Поэтому оценка генетических повреждений у организмов из соответствующей среды обитания является неотъемлемой частью оценки загрязнения окружающей среды (Moore, 2004).

Биоиндикаторы используются для определения токсических свойств воздуха, воды, почвы, промышленных отходов, материалов и т. д. (Ichikawa, 1981; Cebulska-Wasilewska, 1986). В качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды применяют различные виды растительных и животных организмов. Одной из важнейших проблем экогенетического мониторинга является сложность выбора животных и растительных биоиндикаторов, чувствительных к локальным загрязнителям. Так как разные виды и даже популяции внутри вида, могут иметь различную чувствительность к загрязняющим веществам, применение одного биоиндикатора не является правильным подходом при проведении мониторинга.

Экогенотоксикология у животных является относительно новым направлением (Dixon et al., 2002; Leinjans and van Schooten, 2002), при этом наиболее хорошо изучены водные организмы. В ряде исследований на морских и пресноводных организмах было показано, что генотоксические вещества имеют тенденцию накапливаться в организме. Однако многое еще предстоит исследовать в таксонах, принадлежащих к наземной экосистеме (Bonisoli-Alquati, 2014), за исключением дождевых червей (Vasseur and Bonnard, 2014).

В частности, особо чувствительными индикаторами загрязнения среды являются **позвоночные животные**, так как они находятся на разных трофических уровнях экосистем и аккумулируют через пищевые цепи загрязняющие вещества; обладают активным обменом веществ, что способствует быстрому проявлению воздействия негативных факторов среды на организм (Мелехова и др., 2007). Основное преимущество использования позвоночных животных в качестве биоиндикаторов заключается в их физиологической близости к человеку. Основные недостатки связаны со сложностью их обнаружения в природе, поимки и определения вида. Кроме того, эксперименты с животными зачастую дороги, требуют многократной повторяемости для получения статистически достоверных выводов.

Растительные тест-системы также являются достаточно чувствительными объектами для проведения мониторинга уровня генотоксичности окружающей среды (Maluszynska, 2005). Растения составляют значительную часть нашей биосферы и обеспечивают жизненную связь в пищевой цепи. Разработаны высокочувствительные растительные биотесты для оценки мутагенов окружающей среды с применением следующих видов растений: *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Crepis capillaris*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon*

*esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum*, *Tradescantia* клон 4430, *Vicia faba* и *Zea mays* (Grant et al., 1982, Constantin and Owens, 1982).

В последние годы, воздействие физических и химических загрязнителей на целостность и функциональность ДНК было исследовано у многих видов животных, в лабораторных и полевых условиях. Во многих публикациях подчеркивают актуальность выявления воздействия канцерогенных и мутагенных загрязняющих веществ у диких видов животных из различных экологических ниш (Fuerhacker, 2009).

Таким образом, экогенотоксикологические исследования в основном направлены на выявление, тестирование и стандартизацию протоколов на потенциальных биоиндикаторных организмах, которые затем могут быть использованы для выполнения биомониторинга (Beeby, 2001; Sebbio et al., 2014). Такие исследования также направлены на выявление чувствительных и надежных методов тестирования, которые в то же время будут относительно недорогими, воспроизводимыми и подходящими для практического применения.

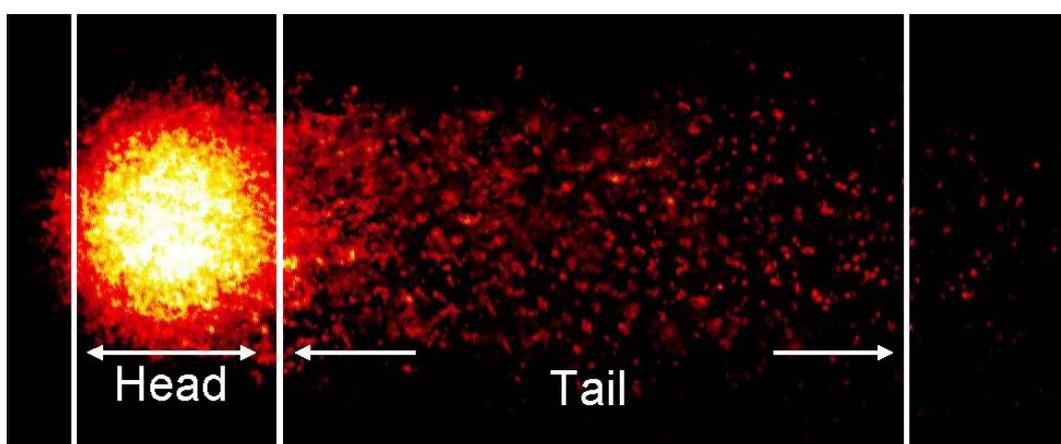
## **1.2. Метод ДНК-комет (гель-электрофорез единичных клеток)**

Более 30 лет назад, О. Ostling и К. J. Johanson разработали новую технику по применению гель-электрофореза единичных клеток для оценки повреждений ДНК и на основе полученных данных опубликовали первую работу (Ostling and Johanson, 1984). Ими была разработана **нейтральная версия** метода ДНК-комет. Генетические повреждения были индуцированы радиацией в клетках млекопитающих. При наличии разрывов ДНК нарушается структурная организация хроматина, формируются отрицательно заряженные двухцепочечные фрагменты ДНК, которые в электрическом поле мигрируют к аноду. В нейтральной среде водородные связи между комплементарными нуклеотидами в молекуле ДНК не нарушаются, и в результате электрофореза в хвост кометы мигрируют только фрагменты образовавшиеся из-за двунитевых разрывов. Они назвали свою технику “microelectrophoresis” (микроэлектрофорез), которая несколько лет спустя была переименована в “comet assay” (метод ДНК-комет) (Olive et al., 1990).

В дальнейшем была разработана **щелочная версия** метода ДНК-комет (pH>13) (Singh et al., 1988), которая позволяет выявлять как двунитевые, так и одонитевые разрывы ДНК,

щелочно-лабильные сайты, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок и сайты неполной эксцизионной репарации.

В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, что и придает наблюдаемым объектам вид «комет», состоящих из головы и хвоста (рис. 1). Количество ДНК, мигрировавшей по направлению к аноду, может использоваться в качестве показателя, характеризующего уровень повреждений ДНК в изучаемых клетках. «Кометы» анализируют либо путем визуального наблюдения и дифференциации «комет» по степени поврежденности ДНК, либо с использованием компьютерных программных средств обработки изображений (Сорочинская и Михайленко, 2008).



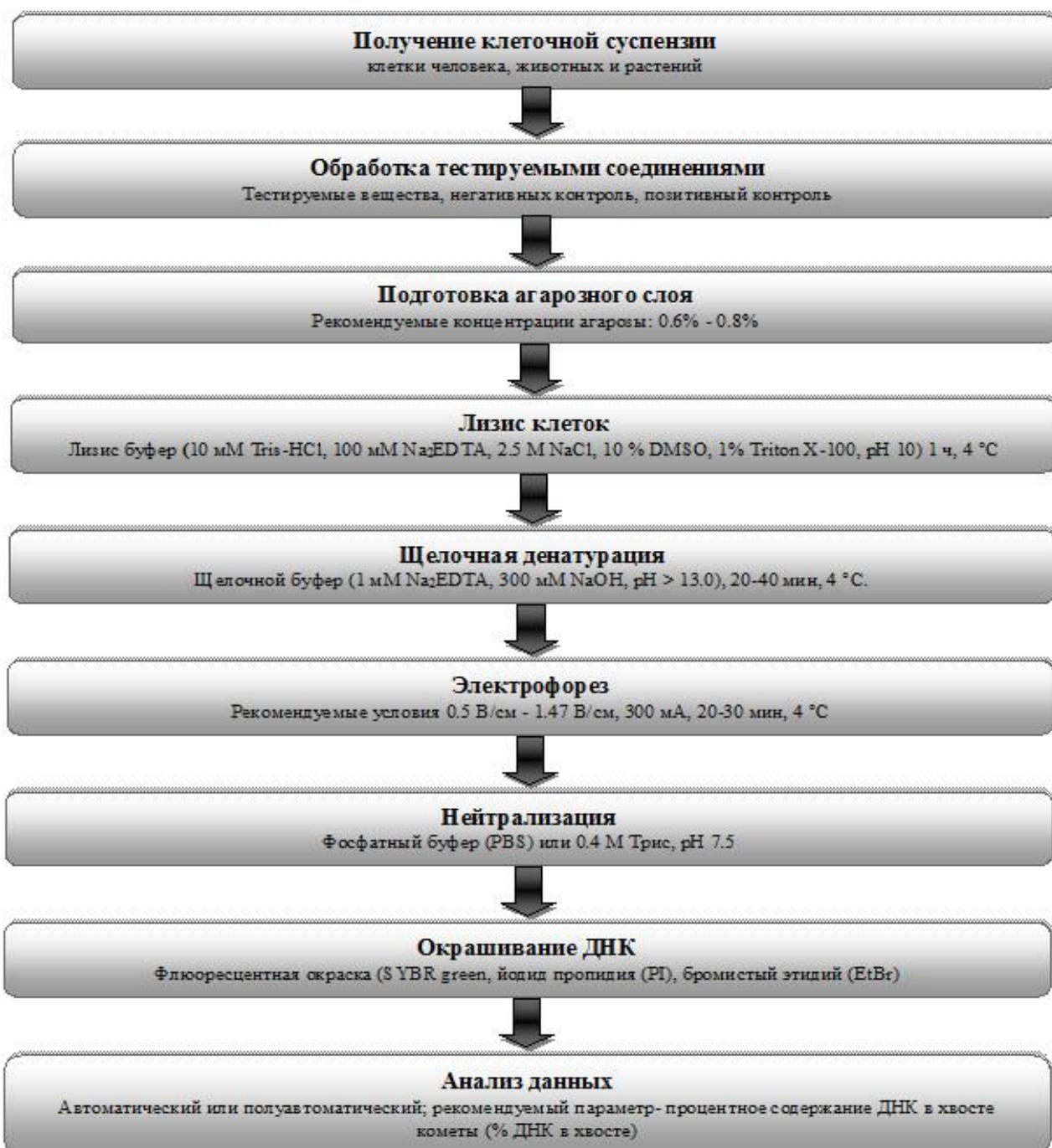
**Рисунок 1.** Изображение кометы

([http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general\\_information/](http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general_information/))

В экотоксикогенетических исследованиях преимущественно используется щелочная версия метода ДНК-комет этапов которой представлены на рис. 2.

С применением программ автоматического анализа можно оценивать различные параметры изображений комет. Чаще всего для оценки повреждений ДНК учитываются следующие параметры комет:

- Процент ДНК в хвосте (% Tail DNA) измеряется по уровню флюоресценции в хвосте. Флюоресценция всей кометы принимается за 100%.
- Длина хвоста кометы или расстояние на которое мигрирует ДНК от центра ядра клетки (Tail Length).
- Момент хвоста Оливе (Olive Tail Moment, OTM), равен произведению расстояния от центра ядра до центра плотности хвоста кометы на % ДНК в хвосте.



**Рисунок 2.** Основные этапы щелочной версии метода ДНК-комет (Glei et al., 2016)

Существуют также и другие версии метода ДНК-комет. В частности, **неклеточная версия** метода ДНК-комет позволяет оценивать влияние генотоксических факторов на ДНК в неклеточной системе (Kiffe et al., 2003). Гибридная версия **метода ДНК-комет с FISH** (fluorescence *in situ* hybridization) позволяет оценивать повреждения и репарацию конкретных участков генома (Novhannisyan, 2010).

**Преимуществами** метода ДНК-комет являются универсальность, надежность, экономичность, эффективность, и быстрота обнаружения повреждений и репарации ДНК практически в любой ткани, а также возможность использования сравнительно небольшого количества исследуемого материала (Collins, 2004; Olive and Banáth, 2006). Однако выявляемые методом ДНК-комет повреждения ДНК могут в дальнейшем репарироваться, что осложняет реальную оценку генетических эффектов. Отсутствие четких стандартов использования метода может стать причиной ложно-положительных результатов.

Метод ДНК-комет позволяет оценивать повреждения и репарацию ДНК у бактерий и в любых эукариотических клетках животных, растений, дрожжей и грибов (Bedekar et al., 2014; Dhawan et al., 2009; Frenzilli et al., 2009; Peycheva et al., 2014).

Метод ДНК-комет позволяет определять генотоксичность *in vivo/in vitro*. Метод был успешно применен для оценки повреждений и/или репарации ДНК в лейкоцитах (Glei et al., 2002b; Glei and Pool-Zobel 2006), клетках эпителия ротовой полости (Glei et al., 2005), ткани слюнных желез (Ersson et al., 2011), первичных клетках толстой кишки (Glei et al., 2006b), на различных (раковых) клеточных линиях, например: HT29 (Munjal et al., 2012), HT29 клон 19A (Glei et al., 2002a, 2003), LT97 (Glei et al., 2007), или HepG2 (Glei et al., 2006a), а также в разных эпителиальных клетках (Rojas et al., 2014), клетках головного мозга (Mohamed and Hussien 2016), сперматозоидах (Cortes-Gutierrez et al., 2014), клетках растений (Ventura et al., 2013), клетках дрожжей (Miloshev et al., 2002), и *Drosophila melanogaster* (Gaivao and Sierra 2014).

### **1.3. Применение метода ДНК-комет в экотоксикогенетике**

Высокая чувствительность метода ДНК-комет и возможность его применения у разных организмов делает его наиболее подходящим методом для экотоксикологических исследований.

За последние десятилетия метод ДНК-комет был применен для оценки генотоксичности разных экосистем с использованием разных видов животных.

Первая работа по применению метода ДНК-комет в экотоксикологических исследованиях с использованием **амфибий** была опубликована в 1996 г. (Ralph et al., 1996). С тех пор, был проведен ряд исследований, с применением метода ДНК-комет у нескольких видов ам-

фибий, в основном *Lithobates clamitans* и *Xenopus laevis*. Эти исследования сосредоточены в основном на определении эффектов воздействия гербицидов (Clements et al., 1997; Liu et al., 2006, 2011; Yin et al., 2008; Meza-Joya et al., 2013), пестицидов (Feng et al., 2004; Yin et al., 2009; Ismail et al., 2014) и других ксенобиотиков, в частности метилметансульфоната (Ralph et al., 1996; Ralph and Petras, 1998b). Метод ДНК-комет на амфибиях был применен для оценки эффектов фунгицидов (Mouchet et al., 2006a), металлов (Wang and Jia, 2009; Zhang et al., 2012), нефтехимического загрязнения (Huang et al., 2007), стойких органических загрязнителей (Gonzalez-Mille et al., 2013), этилметансульфоната (Mouchet et al., 2005a), бензопирена (Mouchet et al., 2005a), сернистых красителей (Rajaguru et al., 2001), антибиотиков (Banner et al., 2007; Valencia et al., 2011) и диметилсульфоксида (ДМСО) (Valencia et al., 2011). Кроме того, с применением метода ДНК-комет у амфибий был проведен биомониторинг загрязненных озер (Erismis et al., 2013), угольных шахт (Zocche et al., 2013), участков захоронения отходов (Maselli et al., 2010), донных осадков (Mouchet et al., 2005b), загрязненных водоемов (Ralph and Petras, 1997, 1998a), а также участков скопления твердых бытовых отходов (Mouchet et al., 2006b).

В области экотоксикогенетики одними из первых животных организмов на которых метод ДНК-комет был адаптирован в качестве инструмента для проведения биомониторинга являются **рыбы** (Pandrangi et al., 1995). Щелочная версия метода ДНК-комет (Singh et al., 1988) с некоторыми модификациями была успешно применена в эритроцитах рыб. В дальнейшем были разработаны разные варианты метода для оценки *in vitro* (Kienzler et al., 2012), *ex vivo* (Santos et al., 2013), *in vivo* (Palanikumar et al., 2013), и *in situ* (Srut et al., 2010).

С 1995 г. метод ДНК-комет был успешно адаптирован для более 90 видов рыб (de Laruelle et al., 2015). С применением метода ДНК-комет на рыбах были изучены эффекты стойких органических загрязнителей (González-Mille et al., 2010), металлов (Velma and Tchounwou, 2013) и пестицидов (Guilherme et al., 2010). Также показана возможность применения рыб для оценки генотоксических эффектов фармацевтических веществ (Rosco et al., 2010), веществ, вызывающих нарушения эндокринной системы (Linhartova et al., 2014), наночастиц (Taju et al., 2014), биотоксинов (Silva de Assis et al., 2013), радионуклидов (Stiazhkina et al., 2012) и ультрафиолетового излучения (Mekrawy et al., 2010).

Исследования, проведенные *in situ* с использованием двусторчатых, показали эффективность применения метода ДНК-комет у **моллюсков**. Повышенные уровни повреждений ДНК зарегистрированные методом ДНК-комет согласуются с повышенным уровнем смеси фоновых токсикантов (Pereira et al., 2011; Martins et al., 2012; Michel et al., 2013). Некоторые авторы отмечают значительное влияние экологических факторов на уровень повреждений ДНК у моллюсков. В частности в теплое время года у них повышается уровень окислительного стресса, что приводит к повышению уровня повреждений ДНК (Almeida et al., 2011; Michel et al., 2013).

Показана также эффективность метода ДНК-комет в экотоксикогенетических исследованиях с применением **раков** (Klobucar et al., 2012; Brittle et al., 2016) и **ящериц** (Schaumburg et al., 2012).

Метод ДНК-комет был успешно применен у **грызунов**. Показан повышенный уровень повреждений ДНК с использованием метода ДНК-комет у лесных мышей *Apodemus sylvaticus* на территориях, загрязненных химическими выбросами (Delgado et al., 2000), с высокой интенсивностью транспортного движения (Borràs and Nadal, 2004) и из участков добычи урана (Lourenço et al., 2013).

Таким образом метод ДНК-комет широко применяется в экотоксикогенетических исследованиях для оценки загрязнения окружающей среды генотоксическими факторами.

#### **1.4. Микроядерный тест**

Разработка микроядерного теста связана с именами Heddle (1973) и Schmid (1975). Считается, что они независимо друг от друга предложили данный тест, основанный на учете микроядер в полихромных эритроцитах костного мозга.

Микроядро – фрагмент ядра в эукариотической клетке, не содержащий полного генома, необходимого для её выживания. Это внутриклеточное хроматиновое образование, имеющее собственную оболочку и обособленное от ядра. Микроядра образуются в делящихся клетках из целых хромосом или же из ацентрических фрагментов, которые не включаются в состав основного ядра в телофазе (Fenech and Morley, 1985). Обычно микроядра образуются в результате неправильного хода клеточного деления или фрагментации ядра в процессе

апоптоза. Таким образом, использование микроядерного теста в его классическом варианте позволяет фиксировать мутации как хромосомного (делеции), так и геномного (анеуплоидии) типов.

Микроядро является патологической структурой и может наблюдаться в клетках любых тканей. Под микроскопом микроядра представляют собой овальные или округлые образования с ровными краями.

Микроядерный тест имеет ряд достоинств и недостатков (Колмакова и др., 2013).

К преимуществам микроядерного теста можно отнести:

- возможность проводить прижизненный неинвазивный скрининг для определения динамики изменения данного показателя во времени;
- применимость данного теста для значительного числа биологических объектов и типов клеток, что особенно важно для видов с большим количеством хромосом или с хромосомами небольшого размера, то есть не зависимо от кариотипа;
- возможность применения в тканях с низкой митотической активностью;
- возможность применения различного рода автоматических анализирующих систем для подсчета клеток с микроядрами и анализ больших выборок;
- стандартная процедура приготовления препаратов хромосом позволяет проводить просмотр с целью обнаружения микроядер на тех же препаратах, на которых проводится определение уровня патологических митозов;

Вместе с тем, в ряде случаев целесообразно использовать данный тест совместно с другими, так как микроядерный тест не позволяет точно установить тип хромосомных аберраций и идентифицировать хромосомы, в которых они произошли.

Микроядерный тест имеет следующие недостатки:

- спонтанный уровень клеток с микроядрами не одинаков у различных линий животных одного вида, а также у разных видов животных и в различных тканях и органах одного и того же организма.
- у одного и того же организма число клеток с микроядрами различно в полихроматофильных и нормохромных эритроцитах крови и в ядродержащих клетках организма (гепатоцитах, энтероцитах, сперматогониях).

- в различных популяциях животных и человека спонтанный уровень клеток с микроядрами может существенно различаться.

Таким образом по сравнению с другими методами подсчет микроядер более прост, дешев, имеет больше шансов на автоматизацию и по чувствительности не уступает метафазному анализу, что открывает перспективы для проведения **популяционных исследований** с его использованием.

### 1.5. Применение микроядерного теста в экотоксикогенетике

Микроядерный тест является одним из широко применяемых методов в экотоксикогенетике для оценки генотоксических эффектов у разных организмов. Анализ микроядер используется для выявления цитогенетических аномалий у животных и растений обитающих в экосистеме с разной степенью загрязненности. Возникновение микроядер может индуцироваться мутагенами различной природы, которые поступают в экосистему различными путями. Быстрораспадающиеся вещества не способны индуцировать микроядра, так как для этого требуется длительное воздействие мутагена на ядерные и митотические структуры клетки.

Микроядерный тест широко применяется у **моллюсков** (Venier et al., 1997; Schiedek et al., 2006; Barsiene et al., 2006) и **рыб** (Rodriguez-Cea et al., 2003; Ali et al., 2008) при оценке загрязнения окружающей среды генотоксическими соединениями. У моллюсков для микроядерного анализа чаще всего используют гемоциты и жаберные клетки, а у рыб эритроциты периферической крови (Bolognesi and Hayashi, 2011).

МЯ тест был валидирован в лабораторных условия в эритроцитах различных видов рыб с применением большого количества генотоксических агентов. МЯ тест в эритроцитах рыб широко применяется для анализа генотоксичности морской и пресной воды *in situ* в лабораторных условиях с различными периодами воздействия токсикантов, а также для анализа уровня микроядер в природных популяциях.

Частота МЯ у рыб, обитающих в пресных водах, является чувствительным биомаркером для выявления генотоксических повреждений, индуцированных нефтехимическими продуктами, тяжелыми металлами и пестицидами (Bolognesi and Hayashi, 2011).

Достоверное повышение уровня микроядер было показано у рыб из загрязненных прибрежных участков Атлантического океана и юго-восточного побережья Средиземного моря. Схожий эффект был продемонстрирован у животных из прибрежных участков Северного и Балтийского морей, где активно добываются нефть и газ (Barsiene et al., 2004).

С использованием МЯ теста генотоксичность меди и цинка, при отдельном и совместном действии показана у двух видов рыб *Synodontis clarias* и *Tilapia nilotica*. Наиболее высокий уровень МЯ в эритроцитах рыб наблюдали при совместном действии меди и цинка (Obiakor et al., 2010).

Микроядерный тест также был успешно применен в гемоцитах речных раков *Astacus leptodactylus* в лабораторных условиях для изучения генотоксических эффектов, вызванных влиянием различных экологических факторов, таких как повышение температуры, состав воздуха или лишение пищи (Malev et al., 2010).

Показана зависимость повышения уровней частоты микроядер от длительности обработки фунгицидом тиофанат-метила (ТМ) у ящериц *Podarcis sicula* по сравнению с контрольной группой. (Carpriglione et al., 2011). С применением микроядерного теста у ящерицы прыткой *Lacerta agilis L.* оценивали генотоксичность различных территорий Республики Марий Эл. Достоверное повышение уровня микроядер было выявлено у ящериц из наиболее загрязненных территорий по сравнению с Государственным природным заповедником (Дробот и Ремизова, 2012).

После экологической катастрофы на химическом комбинате Асналькольяр (Испания) было показано, что после катастрофы у мышей *Mus spretus* частота встречаемости микроядер была достоверно выше по сравнению с контрольной группой (Udroiu et al., 2008).

У мышей *Mus domesticus* из различных участков Рима (Италия) оценивали генотоксичность транспортного загрязнения с применением микроядерного теста. Достоверное повышение частот эритроцитов с микроядрами наблюдалось у мышей из пунктов с наиболее высокой интенсивностью транспортного движения (Ieradi et al., 1996).

Микроядерный тест у традесканции также применяют для оценки загрязненности почв. Было показано, что образцы почвы, содержащие тяжелые металлы, сточные воды с промышленными химическими веществами, продукты разложения боеприпасов, пестициды

и городские отходы индуцируют микроядра в тетрадах микроспор традесканции (Lah et al., 2008; Mielli et al., 2009; Monarca et al., 2002; Cesniene et al., 2010).

Таким образом микроядерный тест является эффективным методом оценки загрязнения окружающей среды.

### **1.6. Рыбы, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды**

Рыбы считаются наиболее адекватным объектом для оценки мутагенных и канцерогенных загрязнителей воды, поскольку они метаболизируют и накапливают в организме содержащиеся в воде химические соединения. Так как рыбы реагируют на токсические соединения аналогично высшим позвоночным, они могут применяться для скрининга химических соединений, потенциально мутагенных и канцерогенных для человека (Ali et al., 2008; de Laruente et al., 2015). Использование рыб как биоиндикаторов водной среды обусловлено следующими причинами: рыбы обладают длительным жизненным циклом, разные виды рыб имеют неодинаковую чувствительность к различным антропогенным токсикантам.

В литературе приводятся данные, полученные с применением рыб в качестве биоиндикаторов *in vitro*, *in vivo* и *in situ* (Cotelle and Ferard, 1999). В частности, для оценки генотоксичности воды *in vitro* применяют первичные культуры тканей рыб, в том числе гепатоцитов. В экспериментах *in vivo* тестируемые вещества вводят рыбам путем инъекций, либо в виде смеси с водой или едой в лабораторных условиях. В экспериментах *in situ* генетические повреждения оценивают в клетках жабр, печени, почек и кишечника и эритроцитах рыб, обитающих в водоемах, загрязненных различными веществами.

В ряде исследований доказывается эффективность применения **клеточных линий и первичных клеточных культур рыб** для оценки генотоксичности широкого спектра веществ, а также водных проб из водоемов *in vitro*. При этом можно избежать гибели животных, что является одним из важнейших преимуществ такого тестирования.

В частности, на клеточных линиях рыб RTL-W1 и RTG-2 проведен анализ поверхностных и осадочных загрязнителей реки Рейн (Западная Европа) методом ДНК-комет и тестом Эймса. Авторы рекомендуют применять оба теста при биомониторинге водных загрязнителей (Kosmehl et al., 2004). Генотоксичность 4-нитрохиолин-1-оксида, бензопирена и других

ксенобиотоков, а также водных проб из естественной среды оценивали на клеточной линии фибробластов RTG-2 и эпителиальной клеточной линии RTL-W1 рыб радужной форели *Oncorhynchus mykiss* методом ДНК-комет (Nehls and Segner, 2001; 2005). В результате обработки **эритроцитов** камбалы *Pleuronectes americanus* перекисью водорода *in vitro* методом ДНК-комет получено достоверное повышение уровней повреждений ДНК. На первичной культуре **гепатоцитов** *P. americanus* показана зависимость повреждений ДНК от дозы перекиси водорода и N-метил-N9-нитро-N-нитрозогуанидина (Nacci et al., 1996). На первичной культуре гепатоцитов радужной форели *Onchorhynchus mykiss* показана генотоксичность перекиси водорода и бензопирена. Изученные химические вещества повышают уровень разрывов ДНК в зависимости от дозы (Devaux et al., 1997). Повреждения ДНК были обнаружены в эритроцитах радужной форели *Salmo irideus in vitro* в условиях окислительного стресса, при этом повреждаются мембраны эритроцитов, а также наблюдается снижение защитных свойств ферментативных систем (Villarini et al., 1998).

Для оценки эффективности рыб в качестве биоиндикаторов изучается воздействие ксенобиотиков **на рыб *in vivo* в лабораторных условиях.**

Внутрибрюшинное введение циклофосфида американскому сомику *Ameiurus nebulosus* приводит к повышению уровней повреждений ДНК в эритроцитах, который не снижается через 24 и 72 ч после инъекции (Pandrangi et al., 1995). После воздействия этилметансульфоната на рыб *Psetta maximus* показано значительное повышение повреждений ДНК в клетках крови, жабр, печени и почек (Velraeme et al., 1998). Рыб данио-рерио *Brachydanio rerio* подвергали воздействию метилметансульфоната. Генотоксичные эффекты метилметансульфоната при низких концентрациях были показаны методом ДНК-комет на клетках жабр и печени. Та же концентрация метилметансульфоната индуцирует микроядра в эритроцитах рыб *B. rerio* (Deventer, 1996). Три вида ткани (кровь, печень и кишки) камбалы *Pleuronectes americanus* были исследованы на наличие повреждений ДНК с применением метода ДНК-комет после 30-дневного воздействия на рыб бензопиреном, добавленным в пищу. В клетках печени у рыб было зарегистрировано повышение уровня повреждений ДНК, однако статистически значимые эффекты были обнаружены только в тканях кишечника (Nacci et al., 1996). Генотоксичность меди и цинка, при отдельном и совместном действии показана у двух видов рыб *Synodontis clarias* и *Tilapia nilotica* с использованием микроядер-

ного теста. Наиболее высокий уровень микроядер в эритроцитах рыб наблюдали при совместном действии меди и цинка (Obiakog et al., 2010). Генотоксичность меди и цинка была показана также с применением рыбы *Oncorhynchus mykiss* (Bagdonas and Vosyliene, 2006). Генотоксичность алюминия показана методом ДНК-комет в эритроцитах рыб *Prochilodus lineatus*. Повышенная активность антиоксидантных ферментов у рыб может быть признаком того, что алюминий вызывает окислительные повреждения ДНК (Galindo et al., 2010).

Однако в некоторых случаях рыбы могут оказаться не столь чувствительными биоиндикаторами по отношению некоторых загрязнителей. Полихлорированные бифенилы (ПХБ), которые по данным Агентства по охране окружающей среды США считаются особо опасными загрязнителями, до сих пор можно обнаружить в водной экосистеме. Разные водные организмы, в том числе и рыбы, активно аккумулируют ПХБ. Однако при их воздействии на рыб *Salmo trutta* генотоксические эффекты методами ДНК-комет и микроядер не выявлены (Belraeme et al., 1996).

**Рыбы, обитающие в природных водоемах,** широко применяются в качестве биоиндикаторов суммарного воздействия загрязнителей водной среды.

Генотоксичность воды из реки Синос (Бразилия) была показана с применением рыб *Hypessobrycon luetkenii* с помощью метода ДНК-комет (Scalon et al., 2013). С применением рыб *Cobitis elongata* была изучена генотоксичность воды рек Сава и Купа (юго-восточная Европа) с различным содержанием Sr, Hg, As, Cu, Cr, Mn. Методом ДНК-комет показано, что у рыб, обитающих в более загрязненной реке Сава, уровень повреждений ДНК выше, чем у рыб из менее загрязненной реки Купа (Korjar et al., 2008). Обнаружена зависимость уровня повреждений ДНК в эритроцитах рыб *Cyprinus carpio*, обитающих в реках Бразилии, от уровня их загрязненности (Rajaguru et al., 2003). Выявлена корреляция между загрязненностью озера, расположенного в районе метрополитена в Бразилии, и повышением уровня повреждений ДНК у рыб *Tilapia rendalli* (Lemos et al., 2005). На основе результатов оценки уровня повреждений ДНК в клетках крови, жабр и печени методом ДНК-комет было показано, что рыба *Squalius cephalus* L. 1758, обитающая в реках Сербии, представляет собой эффективную модель мониторинга водных экосистем. Показано, что клетки жабр являются наиболее чувствительными, а клетки крови – наименее чувствительными к загрязнителям среды (Sunjog et al., 2012b). Повышенный уровень повреждений ДНК был обнаружен в клет-

ках крови *Cyprinus carpio*, обитающей в оз. Моган в Турции, где локализована канализационная система города и куда сбрасываются пестициды, используемые в сельском хозяйстве. Исследования показывают, что оз. Моган может быть загрязнено веществами, которые вызывают генотоксические эффекты (Cok et al., 2011).

Таким образом, рыбы являются чувствительными биоиндикаторами водных загрязнителей. Применение клеточных линий тканей рыб, а также рыб в лабораторных и естественных условиях обитания позволяет оценивать генотоксичность широкого спектра загрязнителей, включая эффекты отдельных химических соединений, а также суммарные эффекты.

### **1.7. Раки, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды**

Пресноводные раки - одиночные донные обитатели, способные аккумулировать загрязняющие вещества в тканях. Они широко распространены, и могут быть относительно легко выловлены (Khan et al., 1995; Anderson et al., 1997; Schilderman et al., 1999). Раки успешно применялись в различных лабораторных исследованиях, а также в условиях *in situ* для оценки мутагенного потенциала загрязнителей и их смесей.

У речных раков *Astacus leptodactylus* в лабораторных условиях были изучены генотоксические эффекты, вызванные влиянием различных экологических факторов стресса, таких как повышение температуры, состав воздуха или лишение пищи. Уровень повреждений ДНК в гемоцитах оценивали методом ДНК-комет и микроядерным тестом. Обнаружена зависимость уровня повреждений ДНК и повышением температуры воды (Malev et al., 2010).

Генотоксичность вод рек Мрежница и Сава в Хорватии оценивали с применением речных раков *Astacus leptodactylus* в качестве биоиндикаторов. Показана зависимость уровней повреждений ДНК в гемоцитах, измеренных методом ДНК-комет, от загрязненности воды. Результаты свидетельствуют о том, что раки представляют собой эффективную модель мониторинга водных экосистем (Klobucar et al., 2012).

Генотоксичность вод реки Маас в Нидерландах была изучена на основе определения ароматических ДНК-аддуктов в клетках гепаропанкреаса раков *Orconectus limosus*. В результате исследования различных участков реки с разной степенью загрязнения было показано, что уровни ДНК-аддуктов, которые могут служить в качестве дозиметра полициклических ароматических углеводородов в гепатопанкреасе раков из наиболее загрязненного пункта

реки были значительно выше по сравнению с менее загрязненными пунктами. Таким образом, было показано, что раки *O. limosus* являются эффективными биоиндикаторами загрязнения водной среды органическими ароматическими веществами (Schilderman et al., 1999).

Генотоксичность инсектицидов дильдрин и хлорпирифоса, а также воды из резервуара Игнасио Рамирес (Мексика) была оценена в клетках головного мозга и гепатопанкреаса пресноводных раков *Cambarellus montezumae* с применением метода ДНК-комет. Показана зависимость между длительностью экспозиции инсектицидами и повышением уровня повреждений ДНК по сравнению с контролем. Вода из резервуара также вызывает повышение уровня повреждений ДНК. Повышенный уровень повреждений ДНК, индуцированный обоими инсектицидами у речных раков, также коррелирует с эффектом перекисного окисления липидов. Предполагается, что наблюдаемые генотоксические эффекты обусловлены, в том числе, окислительным стрессом (Díaz et al., 2015).

Показана потенциальная значимость использования пресноводных раков в качестве биоиндикаторов загрязнения бентоса наносеребром и ионным серебром. Биоаккумуляцию тестируемых веществ измеряли в клетках экзоскелета, гепатопанкреаса, жабр и мышц двух видов пресноводных раков *Orconectes virilis* и *Procambarus clarkii*. Показано, что клетки гепатопанкреаса являются наиболее чувствительными индикаторами загрязнения наносеребром, тогда как клетки жабр и гепатопанкреаса наиболее чувствительны к ионному серебру. Повышение уровней повреждений ДНК в клетках головного мозга *P. clarkii* и *O. virilis* коррелирует с повышением концентрации наносеребра и ионного серебра в воде (Brittle et al., 2016).

Таким образом, раки являются чувствительными биоиндикаторами водных загрязнителей.

## **1.8. Ящерицы, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды**

Чувствительными биоиндикаторами загрязнения среды являются пресмыкающиеся, однако в настоящее время их применение в экогенотоксикологии ограничено (Hopkins, 2000). В качестве биоиндикаторов были использованы разные виды рептилий (Mitchelmore et al., 2005), в том числе змеи (Strunjak-Perovic et al., 2010), крокодилы (Poletta et al., 2008), во-

данные черепахи (Matson et al., 2005; Sparling et al., 2006), а также ящерицы (Hall and Clark, 1982; Talent et al., 2002; Kinney et al., 2008).

Ящерицы, в частности, чувствительны к загрязнению среды тяжелыми металлами. Было показано, что ящерицы *Agama agama* аккумулируют в тканях тяжелые металлы, при этом почки являются более чувствительными, чем печень по отношению к загрязнителям среды (Oyekunle et al., 2012).

Было изучено влияние факторов пола, длины, веса тела, возраста и места происхождения на спонтанный уровень генетических повреждений в эритроцитах периферической крови ящериц *Tupinambis meriana* с применением метода ДНК-комет и микроядерного теста, с целью применения этих ящериц в качестве биоиндикаторов.

Достоверная корреляция между повреждениями ДНК и хромосом и полом, а также длиной и весом тела ящериц не была выявлена (Schaumburg et al., 2012; 2014). Показано, что у новорожденных ящериц уровень повреждений ДНК достоверно выше по сравнению с подростками и взрослыми, тогда как частота встречаемости эритроцитов с микроядрами была ниже по сравнению с подростками, а также достоверно ниже по сравнению с группой взрослых. Результаты спонтанных уровней генетических повреждений, полученных обеими методами, у ящериц свидетельствуют о том, что для проведения биомониторинга следует принимать во внимание фактор возраста (Schaumburg et al., 2014).

В лабораторных условиях генотоксичность гербицида глифосат («Раундап») была оценена в эритроцитах новорожденных ящериц *Salvator meriana* методом ДНК-комет и микроядерным тестом. Данный пестицид широко применяется в сельском хозяйстве, в непосредственной среде обитания ящериц. Яйца ящериц в стадии эмбрионального развития были обработаны разными концентрациями глифосата (50, 100, 200, 400, 800 и 1600 мкг/яйцо). В качестве позитивного контроля использовали циклофосамид, а негативного контроля - дистиллированную воду. Глифосат во всех концентрациях выше 100 мкг/яйцо вызывал достоверное повышение уровня повреждений ДНК по сравнению с негативным контролем. Не выявлены достоверные различия между группами по данным микроядерного теста. Также не были обнаружены тератогенные эффекты глифосата ни в одном из вариантов (Schaumburg et al., 2016).

В лабораторных условиях генотоксичность фунгицида тиофанат-метила (ТМ) оценивали у ящериц *Podarcis sicula* с применением метода ДНК-комет в эритроцитах, микроядерного теста в клетках периферической крови и хромосомных aberrаций в костном мозге. Показана зависимость повышения уровней повреждений ДНК, а также частоты микроядер от длительности обработки фунгицидом. Также показано достоверное повышение хромосомных aberrаций у подопытных животных по сравнению с контрольной группой (Capriglione et al., 2011).

Генотоксичность почвы в различных территориях Северной Армении была изучена с применением скальных ящериц *D. armeniaca* и *D. nairensis* методом ДНК-комет. Уровни повреждений ДНК у ящериц, обитающих в районе Алавердинского медеплавильного завода (Лорийская область) с высоким уровнем загрязнения тяжелыми металлами, были достоверно выше по сравнению с ящерицами из условно чистой территории (с. Дсех той же области) (Stepanyan et al., 2015).

С применением ящерицы прыткой *Lacerta agilis* L. оценивали генотоксичность различных территорий Республики Марий Эл микроядерным тестом. Достоверное повышение уровня микроядер было выявлено у ящериц из наиболее загрязненных территорий г. Йошкар-Олы, прилегающих к ЗАО «Мясо-комбинат» и к заводу «Контакт» по сравнению с Государственным природным заповедником «Большая Кокшага» (Дробот и Ремизова, 2012).

Таким образом, можно заключить, что ящерицы являются чувствительными биоиндикаторами загрязнения окружающей среды генотоксикантами.

## **1.9. Мыши, как биоиндикаторы генотоксического загрязнения окружающей среды**

Распространенные в природе грызуны широко используются в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды из-за их повсеместного распространения, многочисленности, обитания на относительно ограниченном ареале и тесной связи с почвой (Mitkovska et al., 2012 a).

Последствия воздействия генотоксикантов у мышей были показаны с применением метода ДНК-комет (Festa et al., 2003; Mateos et al., 2008; Udriou et al., 2008; Mitkovska et al., 2012 a), микроядерного теста (Abramsson-Zetterberg et al., 1997; Tanzarella et al., 2001; Iearidi et al., 2003; Chassovnikarova et al., 2010), метода хромосомных aberrаций (Metcheva et al., 2001;

Topashka- Ancheva et al., 2003; Michailova et al., 2010) и оценки аномалий сперматозоидов (Ieradi et al., 2003).

Биомониторинг загрязнения окружающей среды до и после утечки токсичных веществ в результате экологической катастрофы на пиритном комбинате Асналькольяр (Испания) был проведен с применением мышей *Mus spretus*, распространенных на территории Национального парка Доньяна. Генетические повреждения оценивали с применением метода ДНК-комет в лейкоцитах периферической крови и микроядер в эритроцитах. После катастрофы у мышей был обнаружен повышенный уровень повреждений ДНК, тогда как спустя год повреждения ДНК значительно снизились (Festa et al., 2003). Показано, что после катастрофы у мышей также имело место повышение частоты микроядер (Udroiu et al., 2008).

Генотоксические повреждения в клетках периферической крови мышей *Mus spretus* из различных участков промышленного района в окрестностях города Уэльва и относительно чистой территории Национального парка Доньяна (Laguna Santa Olalla) в Испании были оценены с применением метода ДНК-комет. Уровни повреждений ДНК у мышей из загрязненных пунктов были достоверно выше по сравнению с условным контролем (Mateos et al., 2008).

У мышей (*Mus domesticus*) из различных участков Рима (Италия) оценивали генотоксичность транспортного загрязнения с применением микроядерного теста и учета аномалий сперматозоидов. Достоверное повышение частот эритроцитов с микроядрами и аномалий в клетках спермы наблюдалось у мышей из пунктов с наиболее высокой интенсивностью транспортного движения. Результаты исследования показали эффективность применения мышей в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды (Ieradi et al., 1996).

Чувствительными биоиндикаторами загрязнения окружающей среды также являются мыши рода *Apodemus* (Berry 1975; Abramsson-Zetterberg et al., 1997; Stopka and McDonald 1999; Atanasov et al., 2000; Adrian et al., 2002; Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003).

Генотоксичность почв из загрязненного и условно-контрольного пунктов в Северной Богемии (Чехия) была оценена микроядерным тестом и с учетом аномалий сперматозоидов у двух видов грызунов *Clethrionomys glareolus* и *Apodemus flavicollis*. Повышенный уровень генетических повреждений был обнаружен у животных из загрязненного пункта, по сравнению с условно-контрольным пунктом. Было показано, что частота микроядер является более эффективным маркером для оценки мутагенности, чем аномалии сперматозоидов, а также, что мыши *A. flavicollis* являются более чувствительными биоиндикаторами генотоксичности окружающей среды, чем *C. glareolus* (Ieradi et al., 2003).

У трех видов диких мышей *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis* и *Mus macedonicus*, распространенных в районе свинцово-цинкового комбината Асеновград (Южная Болгария) и

из условно-контрольного пункта Национального парка Странджа (Юго-Восточная Болгария) были изучены частоты микроядер в эритроцитах периферической крови, хромосомные aberrации в клетках костного мозга и повреждений ДНК в лейкоцитах. В условиях хронического воздействия тяжелыми металлами в районе комбината частоты микроядер и хромосомных aberrаций у мышей достоверно выше по сравнению контролем. Анализ результатов также показал, что виды *A. flavicollis* и *M. arvalis* являются наиболее эффективными биоиндикаторами загрязнения окружающей среды (Mitkovska et al., 2012a). Однако, у мышей *A. flavicollis* из условно-контрольного пункта в 2010 и 2011 годах методом ДНК-комет также выявлен повышенный уровень повреждений ДНК (Mitkovska et al., 2012b).

Эффекты загрязнения окружающей среды на генетические повреждения в клетках периферической крови лесных мышей *Apodemus sylvaticus* были оценены методом ДНК-комет с учетом пола и возраста. Исследование было проведено в различных участках района Антверпена (Бельгия), загрязненных отходами завода цветных металлов. Генетические повреждения в популяциях мышей, обитающих в непосредственной близости от завода, были достоверно выше по сравнению с контрольной популяцией. На наиболее загрязненной территории показана связь между повышением генетических повреждений и возрастом мышей, кроме того уровни повреждений ДНК у самцов были достоверно выше, чем у самок. Тем не менее, не было найдено очевидной связи между уровнями отдельных загрязнителей и индивидуальными генетическими повреждениями (Scheirs et al., 2006).

Таким образом, мыши являются чувствительными биоиндикаторами загрязнителей почвы. Данные, полученные на млекопитающих, в частности на мышах, возможно с наибольшей достоверностью экстраполировать на человека.

#### **1.10. Традесканция, как биоиндикатор генотоксического загрязнения окружающей среды**

**Оценка уровней мутаций и микроядер у традесканции.** Среди растительных тест-объектов особо выделяются гетерозиготные клоны традесканции (клон 02), использование которых позволяет оценить индукцию мутаций под воздействием достаточно низких концентраций ксенобиотиков (Агаджанян и др., 2015). На протяжении длительного периода времени клоны традесканции зарекомендовали себя как высокочувствительные тест-объекты не только для целей биологической дозиметрии, но и в качестве биодетектора химических мутагенов (Осипова и Шевченко, 1984; Grant et al., 1992). Традесканция (клон 02) является

природным межвидовым гибридом между *Tradescantia occidentals* Britton Rudb. и *T. ohiensis* Raf. и представляет диплоидное растение ( $2\times = 12$ ), высота которого достигает 20–45 см. Отличается множеством побегов, на которых развиваются соцветия. В норме цветок традесканции (клон 02) имеет три голубых лепестка, окруженных тремя чашелистиками, один трехлопастный пестик и шесть тычинок. Характерной особенностью цветка является наличие на тычинке 30–50 и более волосков (но может быть и меньше), а каждый волосок, в свою очередь, состоит из 20–35 соматических клеток. Растение гетерозиготно по окраске цветка: голубая окраска детерминируется доминантным генетическим фактором ( $D^+$ ), контролирующим синтез дельфинидина, а розовый цвет – рецессивным фактором ( $C^-$ ), контролирующим синтез цианидина. Данный клон был интродуцирован и прекрасно прижился в резко континентальных климатических условиях Армении. Обладает мощной корневой системой, неприхотлив к почвенным условиям и очень чувствителен к загрязнителям окружающей среды, в частности, к низким концентрациям поллютантов.

Стадия активного деления клеток в волосках тычиночных нитей наиболее чувствительна для возникновения мутаций. При проведении биотеста Трад–ВТН в качестве индикаторных тест–критериев учитываются: изменение окраски клеток–волосков тычиночных нитей с голубых на розовые (рецессивные мутационные события – РМС) и появление бесцветных клеток (неопределенные мутационные события – БМС). При тестировании, кроме соматических мутаций (РМС и БМС), также фиксируются морфологические изменения волосков – карликовые (не выжившие) волоски и разветвленные волоски. Кроме того, учитываются нарушения в строении цветка – изменение числа тычинок (уменьшение), сростание лепестков цветка, изменение окраски цветка (с голубого на розовый или белый) и разного рода другие изменения. Применение микроядерного теста (Трад–МЯ) позволяет фиксировать появление хромосомных aberrаций (acentрические фрагменты или отстающие хромосомы), которые регистрируются в виде микроядер (МЯ) на стадии тетрад при нарушениях процесса микроспорогенеза. При тестировании с применением данного теста фиксируются два тест–критерия: частота образования микроядер и процент тетрад с микроядрами.

Характерной особенностью данных тест–систем (Трад–ВТН и Трад–МЯ) является их высокая чувствительность, отсутствие требования стерильности при тестировании, а также

возможность одновременного учета частоты возникающих мутаций как в соматических, так и в генеративных клетках традесканции.

### **Традесканция, как биоиндикатор загрязнения окружающей среды**

Растительные тест-системы являются достаточно чувствительными объектами для мониторинга генотоксичности окружающей среды (Maluszynska and Juchimiuk, 2005).

Традесканция широко применяется для оценки генотоксичности **отдельных химических соединений**, например тяжелых металлов (Steinkellner et al., 1998; Knasmuller et al., 1998; Majer et al., 2002), органических соединений (Xu and Ma, 1998; Kim et al., 2003) и агрохимикатов (Rodrigues et al., 1998; Mohammed and Ma, 1999), а также **смесей** средовых мутагенов (Duan et al., 1999; Yang, 1999).

Традесканция является чувствительным биоиндикатором оценки загрязнения **воды, почвы и воздуха**.

Повышение уровня микроядер было обнаружено в тетрадах микроспор при обработке традесканции коммунальными сточными водами, а также грунтовыми водами, загрязненными промышленными стоками (Biscardi et al., 2003; Haider et al., 2002; Helma et al., 1998; Steinkellner et al., 1999; Crebelli et al., 2005; Jiang et al., 1999; Monarca et al., 2000; Zeng et al., 1999). С применением теста Трад-МЯ было показано, что обработка питьевой воды дезинфицирующими хлорсодержащими средствами приводит к повышению ее мутагенной активности (Monarca et al., 2003), в то время как использование озона приводит к уменьшению мутагенных эффектов (Monarca et al., 1998).

Показана эффективность традесканции для биомониторинга загрязнения водной среды, на примере оценки генотоксичности вод реки Панлонг в Китае (Duan et al., 1999). Duan с соавторами считают, что при проведении экотоксикогенетических исследований целесообразно оценивать генотоксичность влияния смеси загрязнителей, а не отдельных компонентов (Duan et al., 1999). С применением микроядерного теста у традесканции показано, что высокая генотоксичность воды озера Хонгзе (Китай) может быть обусловлена повышенным содержанием P, Fe и NO<sub>3</sub> (Yang, 1999).

Тест Трад-МЯ также применяют для оценки загрязненности почв. Было показано, что образцы почвы, содержащие тяжелые металлы, сточные воды с промышленными химическими веществами, продукты разложения боеприпасов, пестициды и городские отходы иду-

цируют микроядра (Cabrera et al., 1999; Cotellet et al., 1999; Fomin et al., 1999; Gichner and Vel-eminsky, 1999; Lah et al., 2008; Mielli et al., 2009; Monarca et al., 2002; Cesniene et al., 2010).

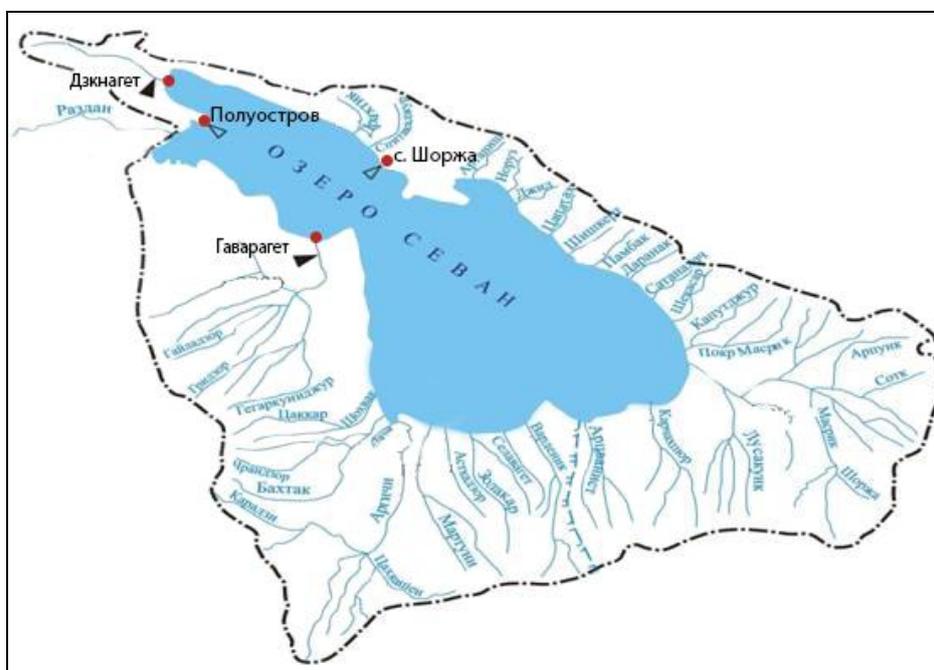
С применением традесканции также оценивают мутагенность воздуха. Исследования показали, что выбросы автомобильного транспорта (Meireles et al., 2009; Klumpp et al., 2006), мусоросжигательных установок и газовых плит, городской воздух (Prajapati and Tripathi, 2008) а также другие загрязнители воздуха индуцируют микроядра в клетках микроспор (Isidori et al., 2003; Solenska et al., 2006; Villarini et al., 2009; Carreras et al., 2006; Carvalho-Oliveira et al., 2005; Guimaraes et al., 2000; Mariani et al., 2009; Savoia et al., 2009).

В ряде исследований показано, что микроядерный тест у традесканции является более чувствительным методом биомониторинга по сравнению с другими растительными тест-системами. В частности, при оценке загрязненности окружающей среды тяжелыми металлами микроядерный тест у традесканции оказался более чувствительным, чем у *A. cerea* и *V. faba* (Steinkellner et al., 1998). При оценке радиационного воздействия  $^{137}\text{Cs}$  чувствительность микроядерного теста у традесканции оказалась выше чем у *V. faba* (Minouflet et al., 2005). При оценке почв, загрязненных сточными водами, микроядерный тест у традесканции оказался более чувствительным, чем у *A. cerea* (Cabrera and Rodriguez, 1999). Тем не менее при оценке озерных вод обработанных дезинфицирующими средствами микроядерный тест у *V. faba* оказался более чувствительным, чем у традесканции (Monarca et al., 2003).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Пункты исследования

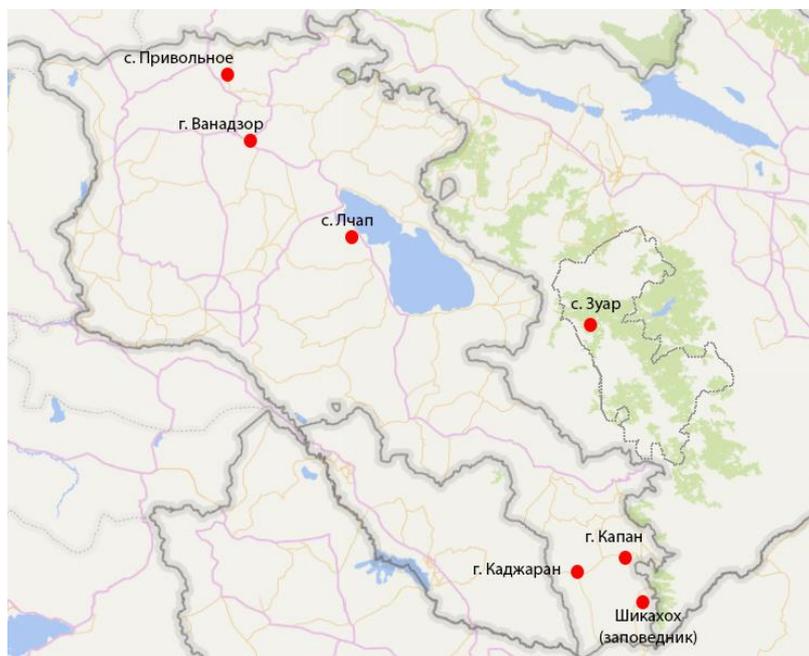
Исследования генотоксичности воды с применением **рыб** и **традесканции** в качестве биоиндикаторов проведены в 4-х пунктах бассейна озера Севан: юго-юго-запад от села Шоржа ( $40^{\circ}28'33''$  с. ш. и  $45^{\circ}14'22''$  в. д.), 3,5 км к востоку от полуострова озера Севан ( $40^{\circ}33'46''$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



**Рисунок 3.** Географическое расположение пунктов исследования генотоксичности воды на территории Армении.

Исследования генотоксичности почвы с применением **ящериц** рода *Darevskia* в качестве биоиндикаторов проводили в Сюникской области в заповеднике «Шикахох» ( $39^{\circ}05'43''$  с. ш. и  $46^{\circ}28'25''$  в. д.) и г. Каджаране ( $39^{\circ}09'04''$  с. ш. и  $46^{\circ}09'36''$  в. д.), в селе Зуар (НКР) ( $40^{\circ}04'39''$  с. ш. и  $46^{\circ}13'47''$  в. д.), в Лорийской области в селе Привольном ( $41^{\circ}00'27''$  с.ш. и  $44^{\circ}23'12''$  в.д.) и г. Ванадзоре ( $40^{\circ}48'46''$  с.ш. и  $44^{\circ}29'18''$  в.д.) и в селе Лчач Гегаркуникской области ( $40^{\circ}27'40''$  с.ш. и  $45^{\circ}03'54''$  в.д.). Исследования генотоксичности почвы с примени-

ем **лесных мышей** в качестве биоиндикаторов проведены в селе Зуар и г. Капане (Сюникская область) ( $39^{\circ}12'04''$  с. ш. и  $46^{\circ}24'54''$  в. д.). Загрязнение почв в Шикахохе и Капане также оценивали с применением **традесканции**. Исследованные пункты представлены на рис. 4.



**Рисунок 4.** Географическое расположение пунктов исследования генотоксичности почвы на территории Армении и НКР.

## 2.2. Биоиндикаторные организмы

Использованные в наших исследованиях биоиндикаторы представлены на рисунке 5. 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 ( $0.49 \text{ M NaCl}$ ,  $30 \text{ mM Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$ , pH 6.0) в соотношении 1:2. Раки и рыбы для экспериментальных исследований были любезно предоставлены Научным центром зоологии и гидроэкологии НАН РА.



**Рисунок 5.** Биоиндикаторы использованные в наших исследованиях: *Carassius auratus gibelio* <http://nature.sfu-kras.ru/node/28> (А), *Astacus leptodactylus* [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a5/Blausteinsee\\_Tierwelt\\_05.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a5/Blausteinsee_Tierwelt_05.jpg) (Б), Традесканция (клон 02) [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8e/Tradescantia\\_ohiensis2.jpg/1024px-Tradescantia\\_ohiensis2.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8e/Tradescantia_ohiensis2.jpg/1024px-Tradescantia_ohiensis2.jpg) (В), ящерицы рода *Darevskia* автор Омид Мозаффари [http://www.reptarium.cz/content/photo\\_04/Darevskia-raddei-03000033630\\_01.jpg](http://www.reptarium.cz/content/photo_04/Darevskia-raddei-03000033630_01.jpg) (Г), *Apodemus uralensis* <http://www.naturfoto.cz/mysice-malooka-fotografie-2979.html> (Д)

Исследования проводили на **двуполых ящерицах** *Darevskia raddei* из заповедника «Шикахах» (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.

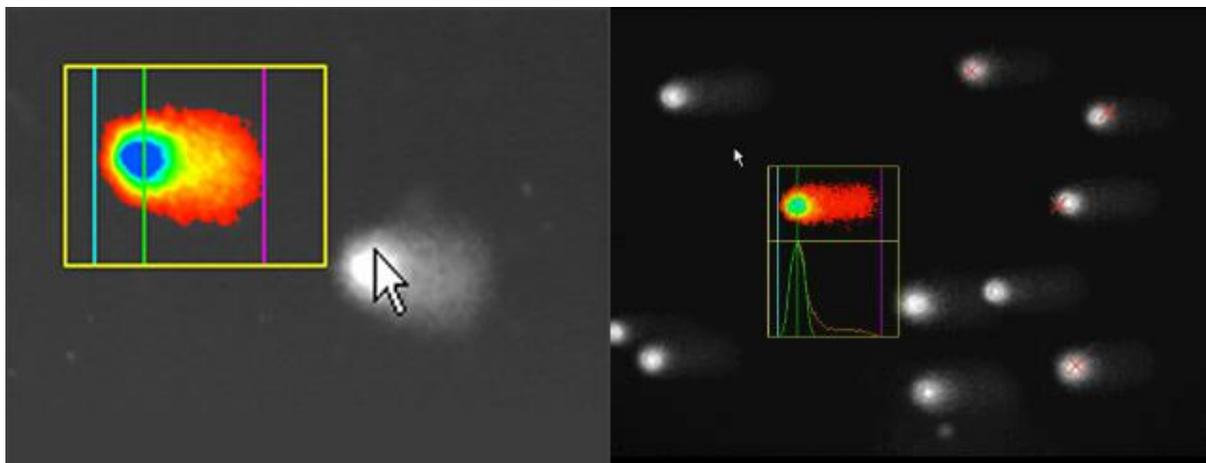
### 2.3. Метод ДНК-комет

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 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 100 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 2.5 М NaCl, 1% Triton X-100, pH 10) на 1 ч при 4 °С.

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 мМ NaOH, 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 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 М Tris, pH 7.5) и окрашивали бромистым этидием (20 мкг/мл).

Автоматический анализ изображений комет проводили с применением коммерческой программы Comet Assay IV (Version 4.3) (рис. 6). Анализировали два параметра повреждений ДНК – % ДНК в хвосте кометы и момент хвоста Оливе.



**Рисунок 6.** ДНК-комета: анализ с помощью программы Comet Assay IV (Version 4.3).

#### **2.4. Микроядерный тест**

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.

#### **2.5. Тест-система традесканции**

С применением тест-системы традесканции (клон 02) оценивали частоты 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 озера Севан в течение 18 ч. 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.

## **2.6. Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка данных проведена с применением теста множественного сравнения, теста Манн-Уитни, t-теста и корреляционного анализа Пирсона программами 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. Загрязнение воды бассейна оз. Севан

Концентрации загрязнителей в четырех участках бассейна озера Севан за период 2006-2012 гг. и 2012 г. представлены в Таблице 1.

Химический анализ воды был проведен к.х.н. С.Г. Минасяном по стандартной методике (АРНА, 1998) в Центре мониторинга воздействия на окружающую среду Министерства охраны природы Республики Армения.

Согласно данным химического анализа устья рек Гаварагет и Дзкнагет более загрязнены по сравнению с участком на юго-юго-западе от села Шоржа и полуостровом озера Севан. Участок озера Севан, расположенный на юго-юго-западе от села Шоржа, как наименее загрязненный, выбран в качестве условного контроля в исследованиях с применением рыб и традесканции. В исследованиях с применением раков условным контрольным пунктом являлся полуостров озера Севан.

Для оценки уровня загрязненности разных участков озера Севан было проанализировано около 65 физико-химических параметров воды, в том числе температура, pH, концентрация растворенного кислорода, тяжелых металлов, металлоидов и нутриентов. В частности проведена оценка содержания Li, Be, B, Na, Mg, Al, P, K, Ti, V, Ca, Cr, Fe, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Br, Sr, Rb, Zr, Mo, Ag, Cd, Se, Sn, Sb, I, Ce, Cs, Ba, W, Tl, Bi, Au, Pt, Ga, Nb, Te, Re, Hg, Pb и Ta.

При сравнении 4-х участков озера Севан было показано, что в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет уровни  $\text{NO}_3$ , Si, Al, P, V, Fe, Mn и Cu достоверно выше по сравнению с сравнительно чистыми участками, по всем остальным параметрам чистые и загрязненные участки не отличались между собой и в дальнейшем анализе не были учтены.

Выбор  $\text{NO}_3$ , Si, Al, общего фосфора ( $\text{P}_{\text{total}}$ ), V, Fe, Mn и Cu для оценки загрязнения и анализа корреляции с уровнем генетических повреждений обусловлен их повышенным содержанием в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет по сравнению с участком на юго-юго-западе от села Шоржа и полуостровом озера Севан.

**Таблица 1.** Концентрация загрязнителей за период 2006-2012 гг. и 2012 г. в четырех участках бассейна озера Севан.

Участок	NO <sub>3</sub> (мг/л)	P <sub>total</sub> (мг/л)	Si (мг/л)	Al (мг/л)	Fe (мг/л)	Mn (мкг/л)	Cu (мкг/л)	V (мкг/л)
2006-2012								
Юго-юго-запад от села Шоржа	0.38	0.07	1.02	0.01	0.09	2.98	0.77	5.30
П-ов озера Севан	0.48	0.05	1.06	0.17	0.07	3.19	0.74	4.89
Устье реки Гаварагет	11.02 <sup>a,b</sup>	0.25 <sup>a,b</sup>	20.65 <sup>a,b</sup>	1.22 <sup>a,b</sup>	0.53 <sup>a,b</sup>	39.73 <sup>a,b</sup>	2.00 <sup>a,b</sup>	22.83 <sup>a,b</sup>
Устье реки Дзкнагет	2.12	0.15	10.99 <sup>a,b</sup>	0.68	0.40 <sup>b</sup>	35.05 <sup>a,b</sup>	1.81 <sup>a,b</sup>	3.45
2012								
Юго-юго-запад от села Шоржа	0.78	0.17	0.69	0.06	0.11	3.38	1.57	6.13
П-ов озера Севан	0.94	0.03	0.98	0.09	0.11	4.78	1.04	6.15
Устье реки Гаварагет	11.33 <sup>a,b</sup>	0.20 <sup>b</sup>	36.99 <sup>a,b</sup>	0.16	0.16	17.85 <sup>a,b</sup>	1.72	16.52 <sup>a,b</sup>
Устье реки Дзкнагет	0.87	0.06	13.55 <sup>a,b</sup>	0.21	0.15	16.61 <sup>a,b</sup>	1.52	1.97

a - достоверно более высокий уровень по сравнению с участком, расположенным на юго-юго-западе от села Шоржа ( $p < 0.05$ )

b - достоверно более высокий уровень по сравнению участком, расположенным на расстоянии 3.5 км к востоку от полуострова озера Севан ( $p < 0.05$ )

Сейсмическая активность является возможной причиной высокого уровня содержания в воде V, Mn и Cu. Реки, впадающие в озеро Севан, приносят Fe, Mn и Cu из действующих шахт. Повышение уровня Si связано с эрозией горных пород и поверхностного стока в реки и озеро. Бытовые и сельскохозяйственные отходы вызывают повышение уровня содержания общего фосфора (P<sub>total</sub>) и NO<sub>3</sub>, что приводит к антропогенной эвтрофикации озера (Даниелян и др., 2011).

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

Генотоксичность воды из четырех участков бассейна озера Севан: юго-юго-запад от села Шоржа, 3.5 км к востоку от полуострова озера Севан, устья рек Гаварагет и Дзкнагет оценивали с применением серебрянного карася *C. auratus gibelio* в 2012 г. Распределение повреждений ДНК в клетках у рыб из участков с разным уровнем загрязнения по параметрам

% ДНК в хвосте и момент хвоста Оливе на примере 50 комет представлены в таблицах 2 и 3. Уровни повреждений ДНК, полученные методом ДНК-комет в эритроцитах рыб *C. auratus gibelio*, обитающих в бассейне озера Севан на юго-юго-западе от села Шоржа, в 3.5 км от полуострова озера Севан и в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет представлены в таблицах 4, 5, 6 и 7. Средние уровни повреждений ДНК в каждой группе приведены в таблице 8 и на рис. 8А. Изображения комет с разными уровнями повреждений ДНК в эритроцитах рыб из озера Севан представлены на рис. 7.

### **3.3. Оценка генотоксичности воды бассейна оз. Севан с применением тест-системы традесканции**

Генотоксичность воды из четырех участков бассейна озера Севан: юго-юго-запад от села Шоржа, 3.5 км к востоку от полуострова озера Севан, устья рек Гаварагет и Дзкнагет изучена с применением растительной тест-системы традесканции (клон 02) в 2012 г. Мутагенность проб воды из различных участков бассейна озера Севан, рассчитанную на основе рецессивных мутационных событий (РМС) на 1000 волосков тычиночных нитей (ВТН) и микроядер (МЯ) в 100 тетрадах представлены в таблице 9. Средние частоты микроядер (МЯ) в тетрадах микроспор приведены также на рис. 8Б. 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 озера Севан (группа 1). Исследованные пункты не различаются по уровням генных мутаций.

**Таблица 2.**

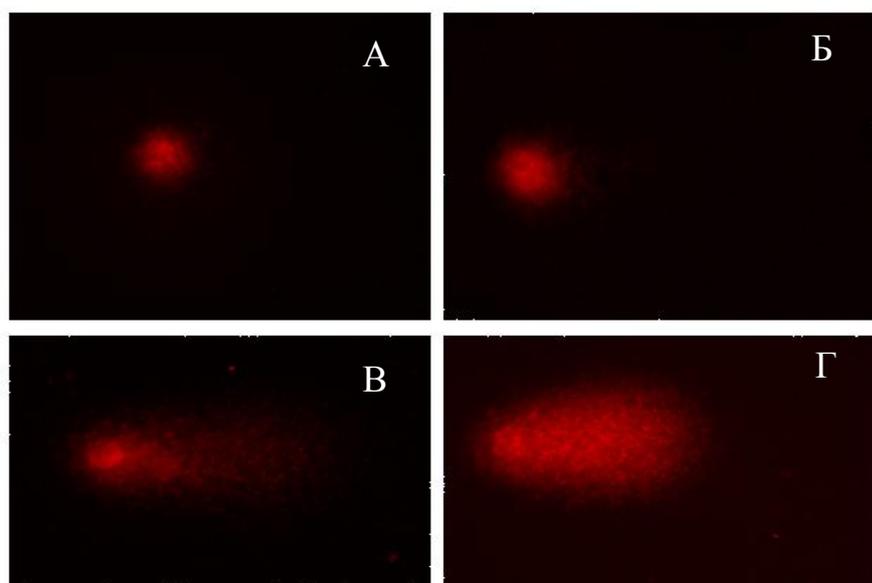
Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у рыб из оз.Севан (юго-запад от села Шоржа).

	% ДНК в хвосте	Момент хвоста Оливе
1.	2.54	0.67
2.	0.51	0.18
3.	16.94	3.81
4.	0.25	0.01
5.	15.05	4.55
6.	20.64	4.61
7.	3.02	0.76
8.	4.29	1.16
9.	25.29	7.63
10.	12.24	2.96
11.	2.97	0.81
12.	11.73	2.65
13.	9.35	2.04
14.	15.41	4.70
15.	13.59	3.10
16.	0.68	0.22
17.	51.26	11.79
18.	10.10	2.78
19.	18.61	4.45
20.	7.43	2.83
21.	2.51	0.63
22.	4.17	0.93
23.	10.93	2.09
24.	2.27	0.53
25.	11.72	4.28
26.	27.23	7.18
27.	25.44	6.70
28.	10.98	3.27
29.	1.88	1.08
30.	33.84	9.09
31.	1.03	0.18
32.	5.36	1.30
33.	10.98	2.32
34.	0.84	0.19
35.	0.01	0.00
36.	13.81	3.53
37.	4.89	1.05
38.	1.33	0.43
39.	1.27	0.35
40.	5.76	1.58
41.	10.29	2.57
42.	6.04	1.48
43.	0.03	0.01
44.	4.62	1.49
45.	13.61	3.85
46.	7.51	1.62
47.	10.47	3.07
48.	3.65	0.94
49.	3.04	0.67
50.	0.03	0.00

Таблица 3.

Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у рыб (устье реки Дзкнагет).

	% ДНК в хвосте	Момент хвоста Оливе
1.	19.81	5.35
2.	63.12	36.17
3.	43.50	22.28
4.	47.95	26.58
5.	46.65	20.91
6.	45.49	21.92
7.	93.20	46.83
8.	36.21	16.67
9.	21.98	8.90
10.	44.34	17.66
11.	32.36	12.99
12.	40.61	14.35
13.	65.62	29.00
14.	48.89	19.08
15.	69.31	26.50
16.	59.53	24.48
17.	25.34	9.38
18.	4.59	1.10
19.	39.62	15.06
20.	84.28	41.56
21.	64.05	33.21
22.	45.86	16.45
23.	79.78	26.77
24.	56.99	26.21
25.	34.72	15.19
26.	24.52	9.84
27.	48.11	25.76
28.	37.10	12.27
29.	41.46	16.58
30.	59.17	29.95
31.	78.40	22.73
32.	31.01	12.65
33.	23.28	5.68
34.	71.94	43.45
35.	22.54	9.11
36.	9.87	2.75
37.	33.99	13.60
38.	66.24	36.91
39.	69.68	34.14
40.	23.48	9.97
41.	21.32	4.91
42.	19.75	9.21
43.	25.17	9.91
44.	34.74	14.60
45.	59.00	36.73
46.	30.19	14.04
47.	37.45	14.45
48.	0.17	0.08
49.	59.73	33.21
50.	52.80	25.85



**Рисунок 7.** Изображения комет с разными уровнями повреждений ДНК в эритроцитах рыб *C. auratus gibelio* из различных участков оз. Севан: юго-юго-запад от села Шоржа (А), 3.5 км к востоку от полуострова озера Севан (Б) и устья рек Гаварагет (В) и Дзкнагет (Г).

**Таблица 4.**

Уровень повреждений ДНК у рыб *C. auratus gibelio*, обитающих в оз. Севан на юго-юго-западе от села Шоржа

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	8.97±0.79	7.35	2.28±0.19	1.79
2	17.98±1.44	12.95	5.02±0.43	3.65
3	8.70±0.76	5.65	2.23±0.20	1.46
4	10.81±1.06	6.97	3.25±0.40	1.93
5	16.90±1.50	10.23	5.95±0.62	3.34
6	17.32±1.65	11.48	3.85±0.37	2.74
7	16.50±1.56	10.04	4.65±0.55	2.59

**Таблица 5.**

Уровень повреждений ДНК у рыб *C. auratus gibelio*, обитающих в оз. Севан в 3.5 км от полуострова озера Севан

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	24.29±1.59	20.68	13.10±1.12	9.76
2	19.67±1.59	15.65	9.88±0.95	7.41
3	14.66±1.20	12.19	6.92±0.76	4.87
4	17.98±1.76	10.94	6.22±0.78	3.30
5	9.97±1.30	5.21	4.57±0.80	1.99
6	17.61±1.47	14.37	5.11±0.49	3.85

**Таблица 6.**

Уровень повреждений ДНК у рыб *C. auratus gibelio*, обитающих в устье реки Гаварагет

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	32.76±2.04	27.18	20.16±1.64	14.68
2	38.10±2.34	31.72	17.83±1.44	12.81
3	38.93±2.31	34.99	28.09±2.15	19.81
4	42.90±2.49	35.08	27.63±2.12	17.71
5	27.23±2.21	20.37	18.69±2.07	9.85

**Таблица 7.**

Уровень повреждений ДНК у рыб *C. auratus gibelio*, обитающих в устье реки Дзкнагет

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	30.72±2.04	22.87	17.60±1.89	8.79
2	47.38±1.96	44.74	21.55±1.14	18.35
3	49.08±2.06	44.83	19.65±1.22	13.72
4	48.21±1.91	47.19	20.64±1.13	19.22
5	62.81±1.75	63.32	38.23±1.48	38.25
6	41.95±1.97	36.98	23.46±1.59	17.15

**Таблица 8.**

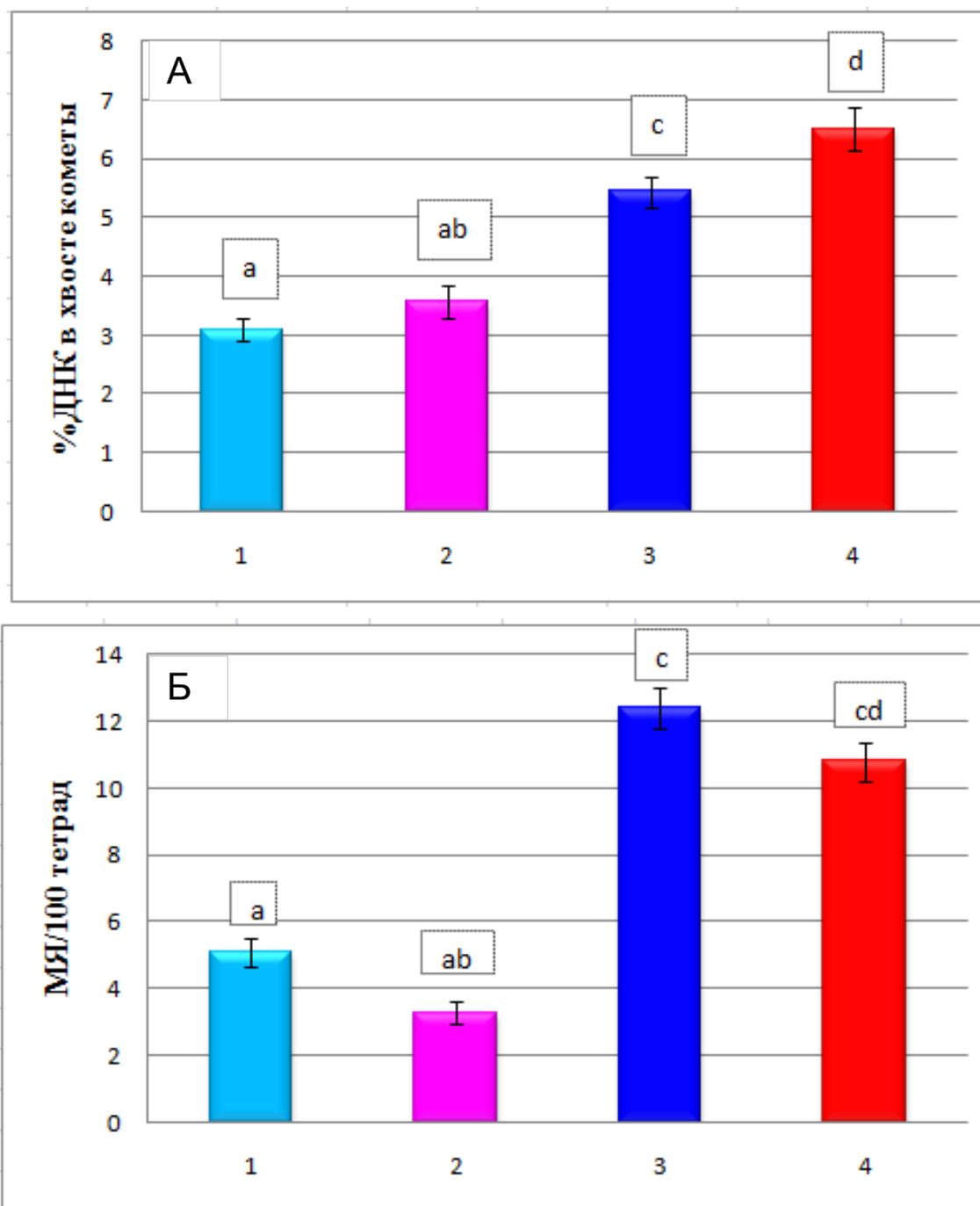
Средние уровни повреждений ДНК у рыб *C. auratus gibelio*, обитающих в различных участках бассейна оз. Севан.

Участок	Количество рыб	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
		Среднее ± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. Ошибка	Медиана
Юго-юго-запад от села Шоржа	7	13.88±1.19	9.24	3.89±0.39	2.49
Полуостров озера Севан	6	17.36±1.49	13.17	7.63±0.82	5.19
Устье реки Гаварагет	5	35.99±2.28	29.87	22.48±1.89	14.97
Устье реки Дзкнагет	6	46.69±1.95	43.33	23.52±1.41	19.24

**Таблица 9.**

Оценка мутагенности проб воды из различных участков бассейна оз. Севан с применением тест-системы традесканции. Уровни рецессивных мутационных событий (РМС) на 1000 волосков тычиночных нитей (ВТН) и микроядер (МЯ) в 100 тетрадах представлены в виде среднего и стандартной ошибки.

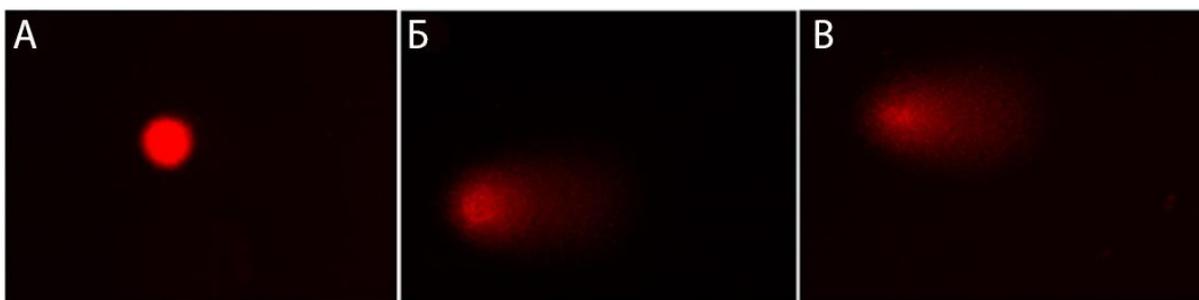
Участок	РМС/1000 ВТН	МЯ/100 тетрада
Юго-юго-запад от села Шоржа	0.70 ± 0.30	5.1 ± 0.40
Полуостров озера Севан	0.80 ± 0.33	3.3 ± 0.32
Устье реки Гаварагет	0.74 ± 0.30	12.4 ± 0.60
Устье реки Дзкнагет	0.82 ± 0.34	10.8 ± 0.56



**Рисунок 8.** 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 озера Севан: юго-юго-запад от села Шоржа (1), 3.5 км к востоку от полуострова озера Севан (2) и устьев рек Гаварагет (3) и Дзкнагет (4) (А) и уровни микроядер (МЯ) (значения представлены в виде средних и стандартной ошибки) у традесканции, обработанной пробами вод из тех же участков (Б). Достоверные различия ( $p < 0.001$ ) между данными отмечены разными буквами.

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

Распределения повреждений ДНК в клетках у раков из участков с разным уровнем загрязнения представлены в таблицах 10 и 11. Уровни повреждений ДНК в гемоцитах речных раков *A. leptodactylus*, обитающих вблизи полуострова озера Севан и в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет, полученные в 2012 г. методом ДНК-комет, приведены в таблицах 12, 13, 14 и на рис. 9. Средние уровни повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus*, обитающих в различных участках бассейна оз.Севан приведены в таблице 15. Множественное сравнение трансформированных данных ( $\sqrt{x}$ ) показывает, что уровень повреждений ДНК у раков из устьев рек Гаварагет и Дзкнагет выше, чем у раков из полуострова озера Севан. У раков из устья реки Гаварагет уровень повреждений ДНК выше, чем у раков из устья реки Дзкнагет (рис. 10).



**Рисунок 9** . Изображения комет с разными уровнями повреждений ДНК в гемоцитах раков *A. leptodactylus* из озера Севан: полуостров озера Севан (А), устья рек Гаварагет (Б) и Дзкнагет (В).

**Таблица 10.**

Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у раков (3.5 км к востоку от п-ва оз. Севан).

	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста Олива
1.	8.90	3.19
2.	49.37	38.80
3.	11.79	4.23
4.	24.17	9.67
5.	0.01	0.00
6.	32.92	13.80
7.	0.28	0.02
8.	0.10	0.04
9.	24.98	6.49
10.	14.95	3.24
11.	10.79	2.39
12.	2.08	1.00
13.	21.66	5.23
14.	0.12	0.01
15.	17.92	4.15
16.	15.28	8.25
17.	6.29	1.39
18.	0.23	0.02
19.	21.52	11.79
20.	8.86	1.98
21.	0.06	0.00
22.	21.30	8.46
23.	17.40	4.54
24.	0.03	0.01
25.	11.54	3.79
26.	0.12	0.04
27.	4.29	1.24
28.	1.16	0.64
29.	22.34	10.72
30.	12.40	2.82
31.	0.06	0.00
32.	7.12	1.51
33.	7.14	2.92
34.	1.69	0.46
35.	0.98	0.32
36.	0.14	0.01
37.	7.00	1.47
38.	0.05	0.01
39.	51.31	19.91
40.	16.47	4.30
41.	1.85	0.61
42.	0.00	0.00
43.	14.01	5.11
44.	2.04	0.75
45.	11.33	4.04
46.	5.84	1.58
47.	27.94	9.55
48.	5.68	1.48
49.	47.98	33.11
50.	29.88	13.80

**Таблица 11.**

Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у раков (устье реки Гаварагет).

	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста Олива
1.	55.2	27.6
2.	62.6	35.8
3.	18.8	5.9
4.	51.6	22.6
5.	65.8	25.1
6.	18.2	8.2
7.	25.1	7.4
8.	69.4	64.0
9.	52.1	23.9
10.	29.8	12.2
11.	57.5	34.8
12.	26.9	19.6
13.	22.5	11.2
14.	42.2	21.1
15.	38.7	24.6
16.	70.0	60.3
17.	49.1	40.2
18.	2.5	0.4
19.	99.8	82.5
20.	12.9	5.2
21.	55.6	28.5
22.	35.9	17.9
23.	64.0	46.6
24.	9.6	2.9
25.	17.3	9.3
26.	35.5	21.3
27.	30.7	10.4
28.	24.7	21.1
29.	24.9	8.8
30.	58.8	48.9
31.	80.7	74.1
32.	69.2	35.9
33.	40.5	35.0
34.	63.5	50.2
35.	29.3	17.2
36.	0.0	0.0
37.	8.6	3.7
38.	31.3	15.1
39.	81.7	79.7
40.	24.7	7.8
41.	30.7	19.7
42.	13.2	4.6
43.	6.5	3.6
44.	55.7	22.0
45.	6.8	2.9
46.	11.1	6.3
47.	22.3	9.3
48.	28.1	13.9
49.	17.1	7.8
50.	26.8	10.8

Таблица 12.

Уровни повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus*, обитающих в оз. Севан в 3.5 км от полуострова оз. Севан

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	10.05±0.95	7.00	3.54±1.54	0.48
2	8.25±0.85	3.71	2.34±0.26	1.02
3	7.56±0.78	3.45	1.88±0.21	0.79
4	6.99±0.94	2.20	2.06±0.30	0.48
5	10.03±1.29	4.49	3.17±0.64	1.28
6	8.30±1.23	1.16	2.07±0.25	0.38

**Таблица 13.**

Уровни повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus*, обитающих в устье реки Дзкнагет.

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	15.78±1.66	9.26	6.89±0.91	2.83
2	10.91±1.22	6.02	3.69±0.64	1.49
3	16.25±1.55	10.62	8.38±1.23	3.23
4	16.73±1.58	12.47	7.08±0.94	3.77
5	13.65±1.26	9.51	4.28±0.42	2.58
6	10.77±1.15	6.31	3.93±0.63	1.60

**Таблица 14.**

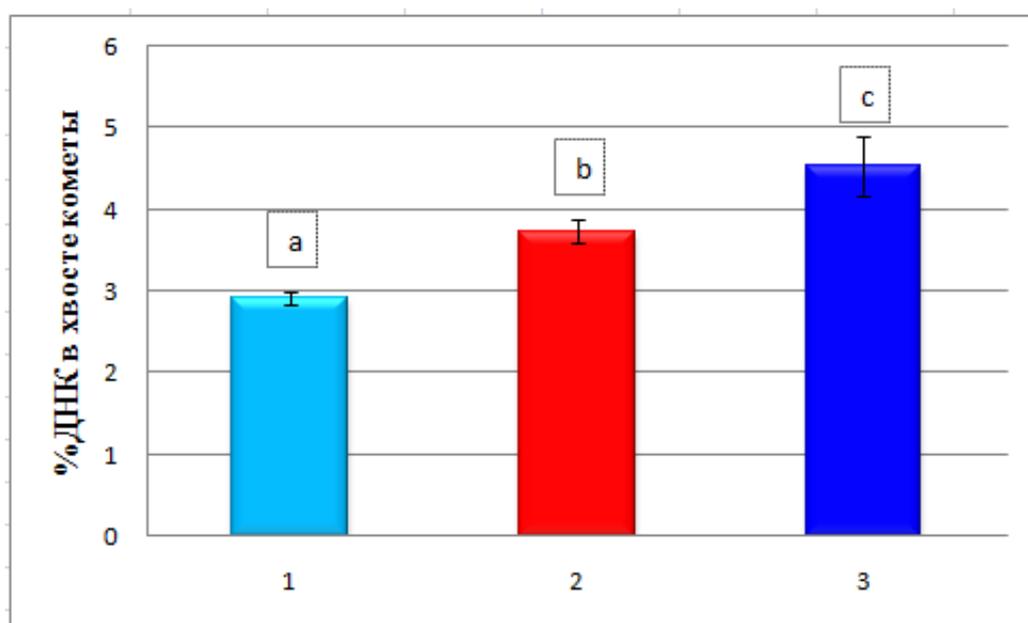
Уровни повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus*, обитающих в устье реки Гаварагет.

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее±ст. ошибка	Медиана
1				
2	33.47±2.10	28.21	20.01±1.90	11.2
3	23.60±1.75	19.17	11.91±1.21	6.99
4	27.02±1.81	25.38	11.81±1.22	7.49
5	16.84±1.29	13.89	7.58±1.00	4.20
6	13.68±1.03	11.09	5.47±0.47	3.34

**Таблица 15.**

Средние уровни повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus*, обитающих в различных участках бассейна озера Севан.

Участок	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. шибка	Медиана	Среднее± ст.ошибка	Медиана
Полуостров озера Севан	8.53±0.42	3.38	2.52±0.16	0.89
Устье реки Дзкнагет	14.02±0.58	8.52	5.71±0.35	2.51
Устье реки Гаварагет	21.23±0.68	17.23	10.15±0.50	5.31



**Рисунок 10.** Уровни повреждений ДНК у раков *A. leptodactylus* из трех участков бассейна озера Севан: 3.5 км к востоку от полуострова озера 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.

### 3.5. 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<sub>3</sub>, P<sub>total</sub>, Si, Al, Fe, Mn, Cu и V в образцах воды (таблица 16).

Выявлена достоверная положительная корреляция между повреждениями ДНК у рыб и уровнями NO<sub>3</sub>, P<sub>total</sub>, Si, Al, Fe, Mn и Cu, а также между повреждениями ДНК у раков и содержанием NO<sub>3</sub>, P<sub>total</sub>, Si, Mn, Cu и V. Уровни микроядер у традесканции достоверно положительно коррелируют с NO<sub>3</sub>, Si, Al, Fe, Mn и Cu. Уровни генных мутаций у традесканции не коррелируют ни с одним из загрязнителей. Корреляция уровней генетических повреждений с NO<sub>3</sub>, 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<sub>total</sub>. Обнаруженные различия в потенциальной чувствительности рыб, раков и традесканции к отдельным загрязнителям подтверждают необходимость совместного применения разных биоиндикаторных систем для эффективного генетического мониторинга.

**Таблица 16.**

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

Рыбы	% ДНК в хвосте кометы	NO <sub>3</sub>	P <sub>total</sub>	Si	Al	Fe	Mn	Cu	V
		0.43*	0.66***	0.69***	0.71***	0.79***	0.87***	0.87***	0.17
Раки	МЯ	0.67**	0.72***	0.75***	0.39	0.39	0.65***	0.71***	0.56*
Традесканция		PMS	0.64**	0.40	0.83***	0.78**	0.92***	0.89***	0.65**
		-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 традесканции позволили выделить две группы участков в бассейне озера Севан. Первая группа включает участки около села Шоржа и полуострова озера Севан, во вторую группу входят устья рек Гаварагет и Дззнагет. Экотоксикогенетические исследования и хи-

мический 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 озера Севан. Таким образом, группировка участков озера Севан по уровням повреждений ДНК у рыб, раков и традесканции соответствует уровням их загрязненности.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что рыбы, раки и традесканция являются чувствительными биоиндикаторами загрязнителей, распространенных в озере Севан. Отсутствие различий между исследованными пунктами по уровням индуцированных у традесканции 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; Sok et al., 2011; Akroilih, 2013), раков (Schilderman et al., 1999; Klobučar et al., 2012) и традесканции (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  $\text{NO}_3$ ,  $\text{P}_{\text{total}}$ , Si, Al, Fe, Mn, Cu и V в формирование наблюдаемых генотоксических эффектов у рыб, раков и традесканции 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., 2012a). 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 ( $\text{NO}_3$ ) и нитритов ( $\text{NO}_2$ ) (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 механизмом токсичности железа может быть индукция повреждений ДНК за счет генерации свободных радикалов кислорода, которые могут стать причиной сайт-специфичных окислительных повреждений (Vuori, 1995). Несмотря на широкую распространённость, 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, NO<sub>3</sub> и P<sub>total</sub> показана методом ДНК-комет у рыб *H.luetkenii* (Scalon et al., 2013). С применением теста Трад-МЯ показано, что высокая генотоксичность воды озера Хонгзе (Китай) может быть обусловлена повышенным содержанием P, Fe и NO<sub>3</sub> (Yang, 1999).

### **3.6. Загрязнение почв в исследованных пунктах на территории Армении**

Для анализа генотоксичности почв выбраны загрязнители, которые по данным литературы наиболее часто исследуются в качестве потенциальных генотоксикантов/мутагенов. Среди загрязнителей особую опасность представляют тяжелые металлы. Для оценки загрязнения почв на территориях села Привольное, Шикахоха, Зуара, Лчапа, Ванадзора, Каджарана и Капана было проанализировано содержание V, Co, Cu, Zn, As, Mo, Cd и Pb. Почва вокруг горно-металлургического комплекса вблизи Каджарана загрязнена тяжелыми металлами (Mo, Cu, Pb, As, Zn, Ni), что обусловлено деятельностью Зангезурского медно-молибденового комбината (Gevorgyan et al., 2015). В Ванадзоре развита химическая, машиностроительная, лёгкая и пищевая промышленность. Капан - центр горнорудной промышленности, там функционируют медно-молибденовый комбинат и обогатительная фабрика.

Химический анализ почв был проведен к.х.н. С.Г. Минасяном по стандартной методике (АРНА, 1998) в рамках проекта "Examination of biodiversity in «Dundee Precious Metals

Капан» CJSC area" в компании "Bio Gama" LLC. Концентрации загрязнителей (г/кг) в почве изученных территорий в 2014 г приведены в таблице 17.

**Таблица 17.**

Концентрация загрязнителей (г/кг) в почве изученных территорий в 2014 г.

Загрязнители	Привольное	Шикаох	Зуар	Лчап	Ванадзор	Каджаран	Капан
V	0.10	0.09	0.06	0.07	0.09	0.29 <sup>a,b</sup>	0.19 <sup>a</sup>
Cr	0.009	0.05	0.49	0.07	0.07 <sup>d</sup>	0.007	0.02
Co	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01
Cu	0.07	0.02	0.04	0.06	0.23 <sup>d</sup>	0.55 <sup>a,b,c</sup>	0.31 <sup>a</sup>
Zn	0.27	0.05	0.09	0.18	0.28	0.04	0.19 <sup>a</sup>
As	0.02	0.006	0.007	0.006	0.03	0.03 <sup>a,b</sup>	0.02 <sup>a</sup>
Mo	0.003	0.0006	0.0006	0.001	0.009 <sup>d</sup>	0.06 <sup>a,b,c</sup>	0.03 <sup>a</sup>
Cd	0.004	0.00018	0.00019	0.00052	0.0007	0.00021	0.002 <sup>a</sup>
Pb	0.55	0.008	0.009	0.013	0.11	0.016 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>

a - достоверно более высокий уровень загрязнения почвы по сравнению с Шикахохом ( $p < 0.05$ )

b - достоверно более высокий уровень загрязнения почвы по сравнению с селом Зуар ( $p < 0.05$ )

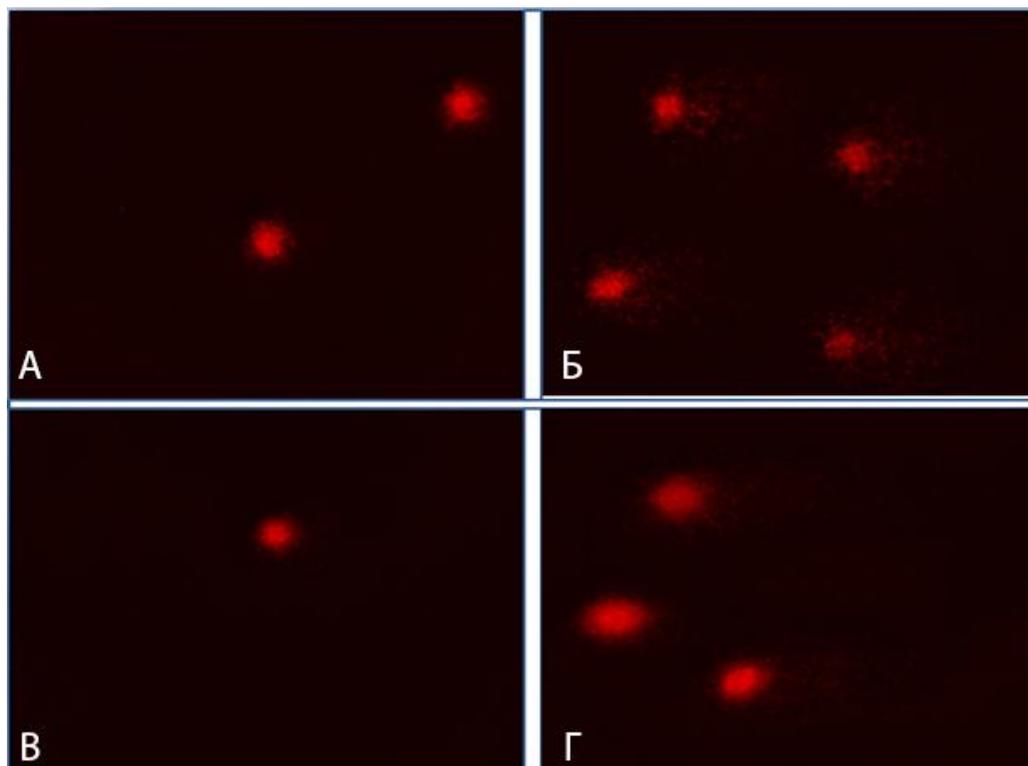
c - достоверно более высокий уровень загрязнения почвы по сравнению с селом Лчап ( $p < 0.05$ )

d - достоверно более высокий уровень загрязнения почвы по сравнению с селом Привольное ( $p < 0.05$ )

### 3.7. 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 поврежденного ДНК методом ДНК-комет. Отсутствие различий между полами позволило объединить самок и самцов в общую группу. Распределения повреждений ДНК в клетках у ящериц из участков с разным уровнем загрязнения представлены в таблицах 18 и 19. Уровни поврежденного ДНК в эритроцитах двуполых ящериц *D. raddei*, из разных мест обитаний полученные методом ДНК-комет, приведены в таблицах 20, 21, 22, 23 и на рис. 11. Уровни повреждений ДНК в эритроцитах самок и самцов двуполых ящериц *D. raddei* приведены в таблице 24.

Средние уровни повреждений ДНК у ящериц *D. raddei*, из ряда регионов Армении приведены в таблице 25.



**Рисунок 11.** Изображения комет с разными уровнями повреждений ДНК в эритроцитах ящериц из различных территорий Армении: с. Зуар (А), г. Ванadzора (Б), с. Лчaп (В) и г.Каджарана (Г).

**Таблица 18.**

Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у двуполых ящериц (с. Лчaп).

	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста Олива
1.	14.46	3.11
2.	11.19	3.06
3.	38.53	9.27

4.	25.81	5.02
5.	24.84	5.37
6.	15.61	3.96
7.	12.79	2.94
8.	9.24	2.36
9.	6.01	1.90
10.	28.97	5.00
11.	22.11	5.47
12.	49.10	8.04
13.	45.42	8.32
14.	12.83	3.02
15.	21.50	4.01
16.	30.83	5.66
17.	26.81	4.56
18.	18.34	3.55
19.	41.80	7.50
20.	15.10	2.34
21.	5.33	1.67
22.	4.77	1.35
23.	26.43	3.85
24.	20.18	3.45
25.	24.08	4.66
26.	4.15	1.48
27.	11.69	1.80
28.	12.58	2.40
29.	23.74	3.84
30.	8.52	1.39
31.	8.36	1.73
32.	26.15	4.07
33.	4.16	1.36
34.	34.67	5.30
35.	1.08	0.27
36.	30.74	5.19
37.	5.57	1.24
38.	2.80	0.74
39.	20.10	3.67
40.	7.04	1.60
41.	4.11	1.10
42.	3.25	1.01
43.	16.37	4.02
44.	1.78	0.56
45.	35.86	5.77
46.	7.76	2.03
47.	27.01	4.93
48.	4.05	0.90
49.	5.65	1.69
50.	9.11	1.85

**Таблица 19.**

Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у двуполых ящериц (г. Каджаран).

	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста Олива
1.	34.51	6.34
2.	47.13	14.40
3.	35.44	6.94

4.	26.47	8.69
5.	5.18	1.41
6.	7.81	2.35
7.	3.75	1.19
8.	21.68	5.56
9.	33.85	4.90
10.	24.56	6.01
11.	29.15	8.69
12.	24.33	4.81
13.	39.08	9.78
14.	20.43	3.38
15.	37.90	6.49
16.	19.41	4.71
17.	53.41	11.95
18.	36.94	6.35
19.	60.38	24.46
20.	44.16	14.96
21.	33.87	9.75
22.	32.56	6.95
23.	27.83	8.13
24.	14.30	4.32
25.	30.65	4.03
26.	20.59	8.54
27.	6.65	1.49
28.	26.79	4.36
29.	10.92	3.83
30.	9.00	2.45
31.	18.58	5.52
32.	39.86	8.65
33.	57.10	12.42
34.	21.91	4.86
35.	55.57	12.70
36.	37.16	6.52
37.	6.20	2.06
38.	10.63	2.61
39.	31.31	7.39
40.	37.03	6.64
41.	14.32	4.84
42.	66.13	16.19
43.	7.58	0.97
44.	20.68	3.90
45.	49.59	8.45
46.	27.81	5.09
47.	31.90	6.90
48.	23.90	6.19
49.	29.80	5.94
50.	60.70	13.36

Таблица 20.

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах самок и самцов двуполых ящериц *D.raddei* из Зуара

Животные	Пол	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
		Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	самец	8.79 ± 0.71	6.84	1.21±0.09	1.02
2	самец	8.04±0.72	4.73	1.25±0.11	0.78
3	самец	6.13±0.54	4.00	0.83±0.07	0.56
4	самец	4.82±0.46	2.75	0.70±0.06	0.44
5	самец	5.97±0.55	3.45	0.84±0.07	0.55
6	самец	7.55±0.62	5.69	1.08±0.08	0.84
7	самец	6.46±0.62	3.21	0.91±0.08	0.54
8	самец	6.91±0.71	3.39	0.96±0.09	0.50
9	самец	7.11±0.62	4.56	0.95±0.08	0.65
10	самец	5.08±0.51	1.85	0.74±0.07	0.36
11	самка	8.39±0.84	3.26	1.19±0.12	0.56
12	самка	7.77±0.74	3.92	1.05±0.09	0.58
13	самка	7.46±0.69	4.55	1.08±0.09	0.67
14	самка	9.21±0.80	5.99	1.48±0.12	1.09
15	самка	7.29±0.73	3.39	1.15±0.10	0.70
16	самка	5.15±0.47	3.03	0.69±0.06	0.37
17	самка	7.98±0.76	4.54	1.19±0.10	0.74

Таблица 21.

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах самок и самцов двуполовых ящериц *D. raddei* из Лча-па

Животные	Пол	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
		Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	самец	14.62±0.85	13.19	2.59±0.14	2.29
2	самец	14.10±0.92	11.57	2.45±0.15	2.09
3	самец	10.6±0.89	6.79	1.68±0.13	1.19
4	самец	13.13±0.98	11.04	2.29±0.19	1.89
5	самец	8.64±0.76	5.23	1.30±0.11	0.78
6	самец	8.83±0.83	4.21	1.29±0.12	0.75
7	самец	9.99±0.94	3.96	1.24±0.12	0.56
8	самец	11.01±0.81	7.92	1.54±0.11	1.25
9	самец	8.99±0.81	4.77	1.26±0.11	0.69
10	самец	8.81±0.76	4.84	1.33±0.11	0.81
11	самка	7.38±0.69	4.20	1.13±0.1	0.66
12	самка	14.09±1.09	11.51	1.88±0.14	1.49
13	самка	10.03±0.96	4.47	1.48±0.14	0.74
14	самка	12.58±0.89	10.46	2.24±0.15	1.95
15	самка	11.84±0.86	8.72	1.85±0.12	1.47
16	самка	9.41±0.71	7.25	1.46±0.11	1.18
17	самка	18.68±1.03	16.85	3.59±0.17	3.36
18	самка	8.41±0.82	4.44	1.21±0.13	0.71

Таблица 22.

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах самок и самцов двуполых ящериц *D.raddei* из Шикахоха.

Животные	Пол	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
		Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	самец	12.59±1.66	8.63	1.97±0.25	1.59
2	самец	7.18±0.57	5.51	1.09±0.09	0.86
3	самец	9.09±0.84	4.53	1.54±0.15	0.83
4	самка	14.51±1.73	11.31	2.65±0.28	2.37
5	самка	17.18±2.07	12.29	3.12±0.36	2.26
6	самка	15.95±1.66	13.61	3.14±0.27	2.81
7	самка	14.99±1.44	12.42	2.92±0.22	2.73
8	самец	8.94±0.66	6.54	1.48±0.10	1.18
9	самка	13.40±1.76	10.04	2.29±0.29	1.76
10	самец	13.33±1.47	10.95	2.4±0.26	2.06
11	самец	11.49±1.54	8.2	1.77±0.23	1.38
12	самка	11.62±1.46	7.6	1.87±0.21	1.47
13	самец	16.89±1.9	13.67	3.1±0.33	2.64
14	самец	11.49±0.84	8.59	1.88±0.13	1.62
15	самец	17.68±1.67	16.74	3.33±0.29	3.23
16	самка	8.69±0.77	5.03	1.33±0.12	0.85
17	самец	11.87±0.91	8.85	2.23±0.20	1.45
18	самка	9.25±0.72	5.93	1.65±0.12	1.22

Таблица 23.

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах самок и самцов двуполых ящериц *D.raddei* из Каджарана

Животные	Пол	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
		Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	самка	33.18±2.64	38u0.59	8.09±0.79	6.94
2	самец	15.18±1.96	11.50	2.33±0.33	1.77
3	самец	22.68±2.65	18.55	4.55±0.59	3.75
4	самец	15.66±2.09	12.55	2.27±0.29	1.79
5	самец	15.78±1.9	11.94	2.08±0.24	1.77
6	самка	12.52±1.43	10.11	1.77±0.18	1.37
7	самка	28.08±2.75	25.09	7.89±1.48	5.13
8	самка	12.64±1.69	9.47	2.02±0.23	1.57
9	самец	10.9±1.36	7.12	1.83±0.23	1.33
10	самка	19.69±2.4	16.08	3.66±0.48	3.02
11	самец	14.91±1.95	10.72	2.24±0.33	1.55

Таблица 24.

Средние уровни повреждений ДНК в эритроцитах самок и самцов двуполых ящериц *D.raddei*

Место- обитание	Количество ящериц	Пол	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
			Среднее ± ст. ошибка	Медиана	Среднее ± ст. ошибка	Медиана
Зуар	7	самки	7.61±0.72	4.09	1.12±0.09	0.67
	10	самцы	6.69±0.61	4.05	0.95±0.08	0.62
Лчап	10	самки	11.55±0.88	8.49	1.86±0.13	1.45
	8	самцы	10.87±0.86	7.35	1.69±0.13	1.23
Шикахох	8	самки	13.19±1.45	9.78	2.37±0.23	1.93
	10	самцы	12.06±1.21	9.22	2.08±0.20	1.68
Каджаран	5	самки	21.22±2.18	18.27	4.68±0.63	3.60
	6	самцы	15.85±1.98	12.06	2.55±0.33	1.99

**Таблица 25.**

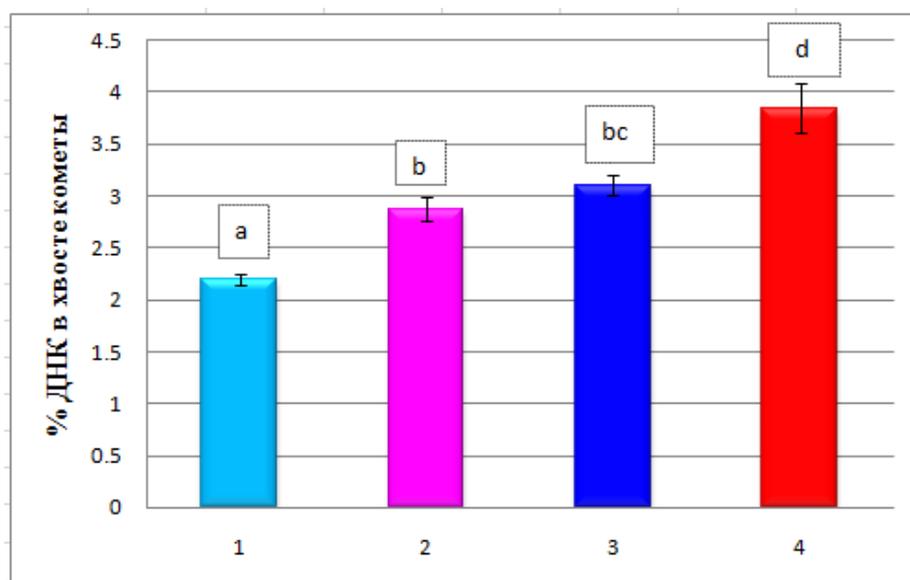
Средние уровни повреждений ДНК в группах двуполовых ящериц *D. Raddei*, включающих самок и самцов

Местообитание	Количество ящериц	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
		Среднее ± ст. ошибка	Медиана	Среднее ± ст. ошибка	Медиана
Зуар	17	7.06±0.65	4.06	1.02±0.08	0.64
Лчап	18	11.17±0.87	7.86	1.77±0.13	1.32
Шикахох	18	12.56±1.31	9.47	2.21±0.22	1.79
Каджаран	11	18.29±2.07	14.88	3.52±0.47	2.73

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. 12).

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах партеногенетических ящериц *D. armeniaca*. из села Привольное и города Ванадзор, а также партеногенетических ящериц *D. unisexualis* приведены в таблицах 26, 27, 28.

У партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из Ванадзора уровень повреждений ДНК достоверно выше, чем у ящериц из села Привольное ( $p < 0.05$ ) (таблица 29).



**Рисунок 12.** Уровни повреждений ДНК у двуполовых 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 комет и стандартной ошибки. Достоверные различия ( $p < 0.001$ ) между данными отмечены разными буквами.

**Таблица 26.**

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из села Привольное.

Животные	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	11.21±1.74	7.41	1.76±0.34	1.10
2	14.22±1.66	12.19	2.21±0.29	1.88
3	14.97±1.55	13.24	2.7±0.3	2.42
4	10.75±1.65	7.32	1.69±0.27	1.19
5	14.74±1.52	12.51	2.49±0.24	2.03
6	11.23±1.64	6.22	1.79±0.25	1.06
7	14.04±1.83	9.77	2.10±0.26	1.57
8	9.96±1.37	6.38	1.54±0.19	1.12
9	11.66±1.44	8.95	1.84±0.21	1.51
10	8.15±1.20	4.58	1.26±0.17	0.89

**Таблица 27.**

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах партеногенетических ящериц *D. armeniaca* из г. Ванадзора.

Животные	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	27.88±2.64	24.3	7.27±0.81	5.96
2	16.69±2.06	13.15	3.39±0.48	2.48
3	22.06±2.49	19.05	4.79±0.71	3.55
4	27.21±2.39	25.04	6.39±0.69	5.23
5	16.04±1.73	13.19	3.13±0.37	2.53
6	19.67±2.36	16.54	3.72±0.57	2.88
7	16.73±1.79	14.52	3.15±0.35	2.67
8	26.34±2.73	22.99	5.91±0.76	4.66
9	16.42±1.89	14.74	2.82±0.39	2.34
10	16.39±1.98	12.85	3.44±0.43	2.58

Таблица 28.

Уровни повреждений ДНК в эритроцитах партеногенетических ящериц *D. unisexualis* из села Лчапа.

Животные	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1.	14.12±0.98	10.79	2.1±0.14	1.63
2.	9.86±0.83	6.39	1.47±0.12	1.09
3.	15.28±0.87	14.03	2.62±0.14	2.47
4.	19.38±1.18	17.86	3.78±0.27	3.26
5.	21.07±1.21	18.17	4.23±0.21	3.71
6.	18.89±1.13	15.52	3.88±0.21	3.32
7.	16.12±1.08	13.21	2.75±0.17	2.24
8.	16.73±1.02	13.8	2.98±0.18	2.44
9.	10.81±0.75	8.48	1.71±0.11	1.46
10.	11.56±0.87	8.62	1.94±0.17	1.40

Таблица 29.

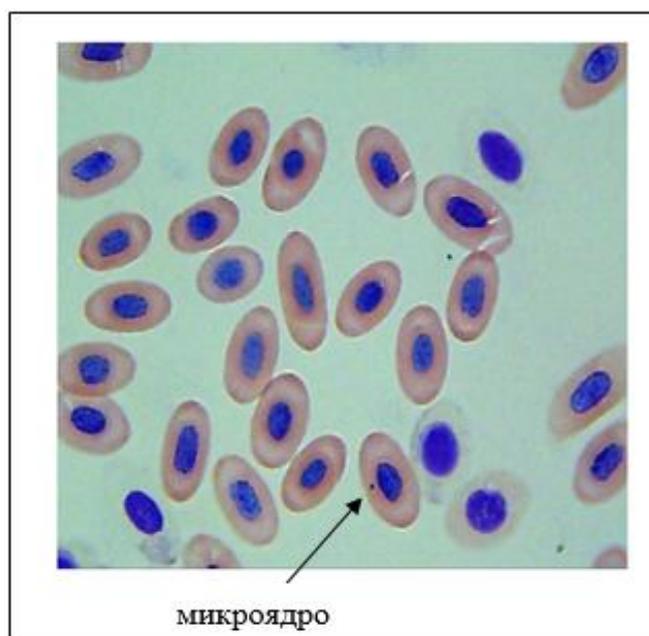
Уровни повреждений ДНК в эритроцитах партеногенетических ящериц *D. armeniaca*

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

### 3.8. Оценка генотоксичности почв с применением двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* микроядерным тестом

У двуполых 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.



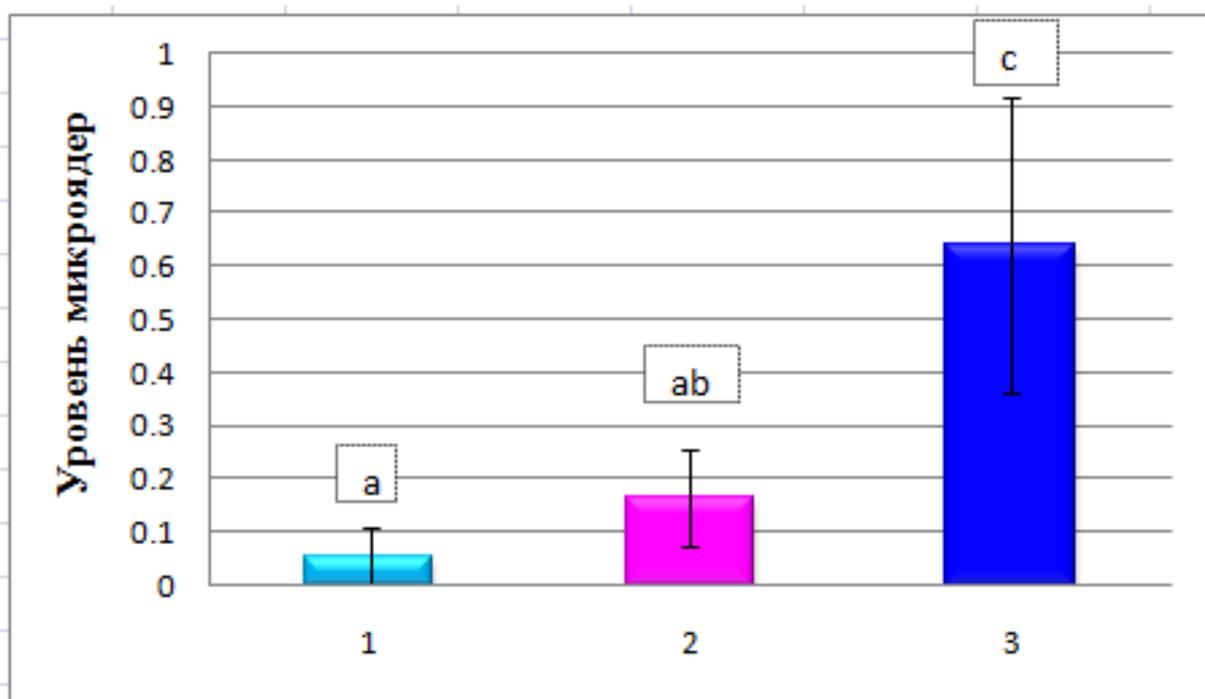
**Рисунок 13.** Микроядро в эритроците у ящерицы рода *Darevskia*

Данные, полученные у самцов и самок объединены в связи с отсутствием различий между полами (таблица 30). Методом множественного сравнения показано, что уровни микроядер у двуполых ящериц *D. raddei* в Каджаране достоверно выше, чем в Лчапе и Шикахохе (рис. 14), 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.

**Таблица 30.**

Средние уровни микроядер на 1000 клеток у двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca*.

Местообитание	Количество ящериц	<i>D. raddei</i>	<i>D. armeniaca</i>
		Среднее ± ст. ошибка	Среднее ± ст. ошибка
Лчап	18	0.06±0.04	-
Шикахох	18	0.17±0.09	-
Каджаран	11	0.64±0.28	-
Привольное	10	-	0.10±0.05
Ванадзор	10	-	0.20±0.13



**Рисунок 14.** Уровни микроядер у двуполых 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.

### 3.9. Сравнение чувствительности двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. unisexualis* к генотоксическим загрязнителям почв

Уровни повреждений ДНК и микроядер у двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. unisexualis*, обитающих на территории села Лчап, по данным 2014 г. представлены в таблице 31. У *D. unisexualis* обнаружен более высокий уровень повреждений ДНК, чем у *D. raddei*, различия в уровнях микроядер не выявлены.

**Таблица 31.**

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

Вид	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе		Микроядра
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка
<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 двуполыми ящерицами

### 3.10. 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. Распределения повреждений ДНК в клетках у мышей из Зуара и Капана приведены в таблицах 32 и 33. Уровни повреждений ДНК у мышей из Капана и Зуара приведены в таблицах 34 и 35. Не показаны различия на основе повреждений ДНК у мышей из Зуара и Капана, несмотря на разную степень загрязнения этих территорий (таблица 36). Не выявлены достоверно положительные корреляции между повреждениями ДНК у мышей *A. uralensis* и уровнем загрязнителей в почве (таблица 37).

Таблица 32.

Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у мышей (с. Зуар).

	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста Олива
1.	0.56	0.10
2.	7.19	1.13
3.	2.01	0.49
4.	13.73	1.97
5.	21.40	3.51
6.	0.02	0.00
7.	8.17	1.19
8.	0.15	0.03
9.	5.26	0.77
10.	26.37	3.87
11.	12.14	1.83
12.	6.17	1.06
13.	2.38	0.60
14.	15.15	2.18
15.	4.53	0.67
16.	5.97	1.05
17.	10.70	1.68
18.	2.58	0.41
19.	1.13	0.17
20.	3.70	0.62
21.	0.07	0.02
22.	31.62	4.37
23.	6.15	0.92
24.	0.20	0.04
25.	7.96	1.25
26.	12.75	1.80
27.	0.05	0.01
28.	0.61	0.02
29.	8.10	0.98
30.	3.46	0.57
31.	0.05	0.01
32.	5.44	0.75
33.	17.32	2.46
34.	0.20	0.02
35.	6.92	1.25
36.	3.57	0.40
37.	14.59	2.18
38.	0.71	0.03
39.	13.46	1.98
40.	5.15	0.73
41.	8.48	0.98
42.	8.63	1.28
43.	11.99	1.64
44.	0.49	0.08
45.	0.26	0.06
46.	5.75	0.95
47.	5.77	0.94
48.	0.26	0.08
49.	0.08	0.01
50.	5.58	0.89

Таблица 33.

Распределение повреждений ДНК в 50 клетках у мышей (г. Капан).

	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста Олива
1.	2.60	0.48
2.	0.64	0.03
3.	0.31	0.01
4.	0.21	0.01
5.	0.10	0.01
6.	12.33	2.04
7.	28.53	4.09
8.	9.76	1.20
9.	0.05	0.01
10.	0.04	0.01
11.	2.54	0.25
12.	13.14	1.96
13.	1.39	0.15
14.	16.68	2.35
15.	4.09	0.62
16.	0.38	0.07
17.	1.22	0.03
18.	8.01	1.08
19.	5.04	0.87
20.	11.96	1.88
21.	0.03	0.01
22.	12.58	1.83
23.	1.38	0.23
24.	0.01	0.00
25.	9.19	1.26
26.	8.28	1.08
27.	3.08	0.40
28.	1.71	0.29
29.	2.92	0.48
30.	2.59	0.40
31.	13.03	1.63
32.	4.53	0.70
33.	0.29	0.01
34.	0.25	0.06
35.	0.19	0.01
36.	1.40	0.26
37.	16.55	2.48
38.	17.68	2.69
39.	0.31	0.06
40.	0.33	0.03
41.	0.62	0.12
42.	39.79	7.09
43.	0.41	0.08
44.	31.96	4.10
45.	0.04	0.00
46.	2.27	0.41
47.	0.87	0.10
48.	4.79	0.70
49.	11.87	1.67
50.	0.45	0.07

Таблица 34.

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

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	8.44±0.85	4.00	1.3±0.13	0.69
2	5.94±0.47	4.38	0.89±0.07	0.65
3	6.93±0.55	4.45	1.08±0.08	0.73
4	6.01±0.54	3.75	0.9±0.08	0.63
5	7.07±0.6	4.63	1.06±0.08	0.67
6	6.74±0.69	2.98	1.01±0.11	0.43
7	5.74±0.63	2.28	0.88±0.09	0.36
8	5.49±0.54	2.91	0.8±0.07	0.46
9	9.04±0.89	4.40	1.42±0.15	0.67
10	7.58±0.8	4.11	1.16±0.13	0.61
11	7.95±0.78	3.49	1.17±0.12	0.50

Таблица 35.

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

Животные	% ДНК в хвосте		Момент хвоста	
	Среднее± ст. ошибка	Медиана	Среднее± ст. ошибка	Медиана
1	5.24±0.52	2.20	0.73±0.07	0.32
2	4.43±0.46	2.24	0.62±0.06	0.31
3	6.13±0.67	2.39	0.97±0.10	0.43
4	6.43±0.66	2.89	0.94±0.09	0.39
5	5.76±0.56	2.76	0.84±0.08	0.41
6	5.80±0.86	1.56	0.96±0.19	0.32
7	6.84±0.62	3.91	1.02±0.09	0.58
8	5.56±0.59	1.98	0.79±0.08	0.30
9	7.75±0.86	2.56	1.12±0.12	0.39
10	9.96±0.93	5.07	1.5±0.14	0.76
11	9.14±0.82	5.12	1.32±0.12	0.79

Таблица 36.

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

Местообитание	% ДНК в хвосте кометы		Момент хвоста Оливе	
	Среднее ± ст. ошибка	Медиана	Среднее ± ст. ошибка	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

**Таблица 37.**

Коэффициент корреляции Пирсона между повреждениями ДНК у мышей *A. uralensis* и уровнем загрязнителей в почве.

Загрязнители	% ДНК в хвосте кометы
V	-0.28
Co	0.14
Cu	-0.20
Zn	-0.31
As	-0.34
Mo	-0.21
Cd	0.19
Pb	0.18

### 3.11. 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 38). 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 38.**

Уровни микроядер (МЯ) в тетрадах микроспор и рецессивных мутационных событий (РМС) в ВТН традесканции, выращенных в пробах почв из изучаемых участков. Данные представлены в виде средних  $\pm$  ст. ошибки.

Пробы почв	МЯ	РМС
Шикахох	3.50 $\pm$ 0.57	0.49 $\pm$ 0.69
Капан	6.30 $\pm$ 0.76**	0.85 $\pm$ 0.59

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

### 3.12. 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.

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 39).

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 39).

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 39.**

Коэффициенты корреляции Пирсона ( $r$ ) между уровнями повреждений ДНК и микроядер (МЯ) у двуполовых 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 двуполовых ящериц *D. raddei* позволили выделить участки с относительно высоким (Каджаран) (Gevorgyan et al., 2015) и относительно низким (Зуар, Лчап 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, Лчапом 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 вы-

сокой 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 Capriglione et al. (2011); Schaumburg et al. (2012; 2015), Дробот, Ремизова (2012) и Stepanyan et al. (2015).

Вблизи села Лчап ареалы обитания двуполых и партеногенетических ящериц рода *Darevskia* перекрещиваются, что позволило сравнить их чувствительность к локальным загрязнителям. Выявлено, что партеногенетические ящерицы *D. unisexualis* более чувствительны к загрязнителям среды, чем двуполые ящерицы *D. raddei*. У особей генетически однородных популяций чувствительность к загрязнителям среды может различаться. Партеногенетические 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 партеногенетических 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 о 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; Cēsniēnē 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 Stepanyan 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 не-

большим, 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 почв. 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена разработке системы экогенетического мониторинга загрязнителей водной среды и почвы в Армении и Нагорно-Карабахской Республике (НКР) с применением растительных и животных биоиндикаторных организмов.

Генотоксичность водных загрязнителей бассейна озера Севан (юго-юго-запад от села Шоржа, 3.5 км к востоку от полуострова озера Севан и в устьях рек Гаварагет и Дзкнагет) оценивали у раков и рыб с применением метода ДНК-комет. Мутагенность и кластогенность из тех же участков бассейна озера Севан оценивали у традесканции с применением микроядерного теста (Трад-МЯ) и рецессивных мутационных событий в волосках тычиночных нитей (Трад-ВТН).

Генотоксичность почвы на территориях с относительно низким (село Привольное (Лорийская область), село Лчап (Гегаркуникская область), Государственный заповедник «Шикахох» и село Зуар (НКР)) и высоким (г. Каджаран и г. Капан (Сюникская область), г. Ванадзор (Лорийская область)) уровнями загрязнения оценивали методами ДНК-комет и микроядер у ящериц, мышей и тест-системой традесканции.

**Оценка генотоксичности воды бассейна озера Севан с применением метода ДНК-комет у раков и рыб, и с применением тест-системы традесканции.** Повышенный уровень генотоксичности вод из устьев рек Гаварагет и Дзкнагет по сравнению с участками вблизи села Шоржа и полуострова озера Севан, выявленный с применением рыб, раков и традесканции в качестве биоиндикаторов, коррелирует с содержанием  $\text{NO}_3$ , Si, Mn и Cu в воде.

**Оценка генотоксичности почв с применением двуполых ящериц *D. raddei* и партеногенетических ящериц *D. armeniaca* методом ДНК-комет.** Повышенный уровень генотоксичности почв в Каджаране по сравнению с Шикахохом, Лчапом и Зуаром выявлен с применением двуполых ящериц *D. raddei*. Повышенный уровень генотоксичности почв Ванадзора по сравнению с селом Привольное показан с применением партеногенетических ящериц *D. armeniaca*. Уровни повреждений ДНК как у двуполых, так и у партеногенетических ящериц коррелируют с Cu и Mo, таким образом можно предположить что ящерицы наиболее чувствительны с этим загрязнителем. Двуполые ящерицы также чувствительны к

As и V. Партегенетические ящерицы *D.unisexualis* более чувствительны к загрязнителям окружающей среды, чем двуполые ящерицы *D.raddei*.

**Оценка генотоксичности почвы с применением мышей в качестве биоиндикаторов.** Несмотря на более высокий уровень загрязненности почвы Капана по сравнению с Зуаром различий между повреждениями ДНК у мышей, обитающими на этих территориях, не выявлено.

**Оценка генотоксичности почвы с применением традесканции.** Повышенный уровень генотоксичности почв в Капана по сравнению с Шикахохом показан с применением микроядерного теста у традесканции, при этом уровни соматических мутаций в тех же растениях не различаются. Уровни микроядер у традесканции коррелируют с содержанием As, Cu, Zn, V, Mo, Pb и Cd в почве.

Полученные данные свидетельствуют, что организмы, обитающие в более загрязнённых водных и почвенных экосистемах, демонстрируют более высокие уровни повреждений ДНК и хромосом. Все биоиндикаторы, за исключением мышей, проявили чувствительность к генотоксикантам среды их обитания.

В целом убедительно продемонстрировано, что одновременное использование животных и растительных тест-объектов существенно расширяет представление об уровне загрязненности окружающей среды в Армении.

## 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 традесканции в качестве тест-объектов, положительно коррелирует с содержанием в воде  $\text{NO}_3$ , 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, ассоцииро-

ванные с генотоксическими эффектами. В целом, на основе генетического тестирования выбраны растительные и животные тест-объекты, наиболее адекватные для генетического мониторинга различных экосистем Армении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramsson-Zetterberg L., Grawe J., Zetterberg G. Spontaneous and radiation-induced micronuclei in erythrocytes from four species of wild rodents: a comparison with CBA mice. *Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1997; 393: 55-71.
2. Adrian M., Johnson M. S., Cooke J. A. Lead within ecosystems on metalliferous mine tailings in Wales and Ireland. *Sci. Total Environ*. 2002; 299: 177-190.
3. Akpoilih B.U. Fish Ecogenotoxicology: an Emerging Science, an Emerging Tool for Environmental Monitoring and Risk Assessment. *J. Environ. and Toxicol*. 2013; 9(1):233–242.
4. Ali F.K., El-Shehawi A.M., Seehy M.A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *African Journal of Biotechnology*. 2008; 7: 606-612.
5. Almeida C., Pereira C., Gomes T., Bebianno M.J., Cravo A. DNA damage as a biomarker of genotoxic contamination in *Mytilus galloprovincialis* from the south coast of Portugal. *J. Environ. Monit*. 2011; 13: 2559–2567.
6. Anderson M.B., Preslan J.E., Jolibois L., Bollinger T.E., George W.J. Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *J. Hazard. Mater*. 1997; 54: 15–29.
7. Anderson S., Sadinski W., Shugart L. et al. Genetic and molecular toxicology: a research framework. *Environ. Health Perspect*. 1994; 102 (12):3–8.
8. Angeletti D., Carere C. Comparative ecogenotoxicology: Monitoring the DNA of wildlife. *Current Zoology*. 2014; 60 (2): 252–254.
9. APHA—American Public Health Association. In: Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds), *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th edn. Washington, DC. 1998; 7–49.
10. Atanassov N., Chassovnikarova T., Markov G. Zoomonitoring in Regional background station “Strndzha”: Cytogenetic characteristic of *Apodemus flavicollis* Melch. – In: *Procc. “75 years forestry education in Bulgaria”*, Sofia. 2000; 227-230.
11. Bagdonas E., Vosyliene M.Z. A Study of Toxicity and Genotoxicity of Copper, Zinc and their Mixture to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija*. 2006; 1:8-13.

12. Banner S. H., Ruben L. N., Johnson R. O. Bleomycin-induced DNA damage and repair in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 2007; 307A : 84–90.
13. Barsiene J., Lazutka J., Syvokiene J., Dedonyte V., Rybakovas A., Bagdonas E., Bjornstad A., Andersen O. K. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. *Environ. Toxicol.* 2004; 19:365–371.
14. Barsiene J., Schiedek D., Rybakovas A., Syvokiene J., Kopecka J., Forlin L. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 2006; 53:469–478.
15. Bedekar P.A., Saratale R.G., Saratale G.D., Govindwar S.P. Oxidative stress response in dye degrading bacterium *Lysinibacillus* sp. RGS exposed to Reactive Orange 16, degradation of RO16 and evaluation of toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014; 21:11075–11085.
16. Beeby A. What do sentinels stand for? *Environ. Pollut.* 2001; 112:285–298.
17. Belpaeme K., Cooreman K., Kirsch–Volders M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res (Genet Toxicol EM)*. 1998; 415:167-184.
18. Belpaeme K., Delbeke K., Zhu L., Kirsch–Volders M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 1996; 11: 485–492.
19. Berry R. J. On the nature of the genetical distance and island races of *Apodemus sylvaticus*. *Journal of Zoology*. 1975; 176: 293- 296.
20. Bickham J. W., Sandhu S. S., Hebert P. D. N., Chikhi L., Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 2000; 463:33–51.
21. Biscardi D., Monarca S., De Fusco R., Senatore F., Poli P., Buschini A., Rossi C., Zani C. Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by *Tradescantia*/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. *Sci. Total Environ.* 2003; 302:101–108.
22. Bolognesi C., Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*. 2011;26(1):205-13.

23. Bonisoli-Alquati A. Avian genetic ecotoxicology: DNA of the Canary in a coalmine. *Curr. Zool.* 2014; 60: 285–298.
24. Borràs M., Nadal J. Biomarkers of genotoxicity and other end points in an integrated approach to environmental risk assessment. *Mutagenesis.* 2004; 19:165–168.
25. Breton J., Le Clère K., Daniel C., Sauty M., Nakab L., Chassat T., Dewulf J., Penet S., Carnoy C., Thomas P., et al: Chronic ingestion of cadmium and lead alters the bioavailability of essential and heavy metals, gene expression pathways and genotoxicity in mouse intestine. *Arch Toxicol.* 2013; 87(10):1787–1795.
26. Brittle S.W., Paluri S.L., Foose D.P., Ruis M.T., Amato M.T., Lam N.H., Buttigieg B., Gagnon Z.E., Sizemore I.E. Freshwater Crayfish: A Potential Benthic-Zone Indicator of Nanosilver and Ionic Silver Pollution. *Environ Sci Technol.* 2016;50(13):7056-65.
27. Cabrera G. L., Rodriguez D. M. G. Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. *Mutat. Res.* 1999; 426:207–210.
28. Cabrera G. L., Rodriguez D. M. G., Maruri A. B. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. *Mutat. Res.* 1999; 426:201–206.
29. Capriglione T., De Iorio S., Gay F., Capaldo A., Vaccaro M.C., Morescalchi M.A., Laforgia V. Geno-toxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology.* 2011;20(4):885-91.
30. Carreras H. A., Pignata M. L., Saldiva P. H. N. In situ monitoring of urban air in Cordoba, Argentina using the *Tradescantia micronucleus* (Trad-MCN) bioassay. *Atmos. Environ.* 2006; 40:7824–7830.
31. Carvalho-Oliveira R., Pozo R. M. K., Lobo D. J. A., Lichtenfels A., Martins-Junior H. A., Bustilho J., Salki M., Sato I. M., Saldiva P.H.N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil. *Environ. Res.* 2005; 98:1–7.
32. Cavas T., Ergene-Gozukara S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol.* 2005;74:264–271.

33. Cebulska -Wasilewska A. Somatic mutations in *Tradescantia* as a model system for studying the effects of the environmental agents. IFJ Raport No.1335/B. Institute of Nuclear Physics, Krakow. 1986.
34. Cesniene T., Kleizaite V., Ursache R., Zvingila D., Radzevicius A., Patamsyte J., Rancelis V. Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by *Tradescantia* bioassays. *Mutat Res.* 2010;697(1-2):10-8.
35. Cėsnienė T., Kleizaitė V., Ursache R., Žvingila D., Radzevičius A. Relation between soil contamination with metals in military training grounds and genotoxicity revealed by *Tradescantia* assays. *BIOLOGIJA.* 2007; 53(3):6–11.
36. Chassovnikarova T., Atanassov N., Kalaydzhieva V., Dimitrov H. Micronucleus test from free living rodents as a biomarker for environmental stress in situ. *Biotechnology& Biotechnological Equipment.* 2010; 24: 390-396.
37. 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; 29:277–288.
38. Cok I., Ulutaş O.K., Okuşluk O., Durmaz E., Demir N. Evaluation of DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by comet assay for determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara). *Scientific World Journal.* 2011; 11:1455–1461.
39. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3):249-61.
40. Constantin M.J., Owens E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays, A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 1982; 99:1-12.
41. Cortes-Gutierrez E.I., Lopez-Fernandez C., Fernandez J.L., Vila-Rodriguez M.I., Johnston S.D., Gosalvez J. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. *Front Genet.* 2014; 5:404.
42. Cotelle S., Férard J.F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ Mol Mutagen.* 1999; 34(4):246-55.

43. Cotelle S., Masfaraud J. F., Ferard J. F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat. Res.* 1999; 426:167–171.
44. Crebelli R., Conti L., Monarca S., Feretti D., Zerbini I., Zani C. Veschetti E., Cutilli D., Ottaviani M. Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater. *Water Res.* 2005; 39:1105–1113.
45. Damek-Poprawa M., Sawicka-Kapusta K. Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland, *Toxicology.* 2003; 186: 1–10.
46. de Lapuente J., Lourenço J., Mendo S.A., Borràs M., Martins M.G., Costa P.M., Pacheco M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Front Genet.* 2015; 6:180.
47. Delgado E., Borràs M., Nadal J. Genotoxic assessment of urban dumping sites: Comet Test in wood mouse circulating lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 2000; 91:116–118.
48. Devaux A., Pesonen M., Monod G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol in Vitro.* 1997; 11:71–79.
49. Deventer K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1996; 56:911–918.
50. Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25:5–32.
51. Díaz S., Arceo B., Martínez-Tabche L., Alvarez-González I., López López E., Madrigal-Bujaidar E. Toxicity induced by dieldrin and chlorpyrifos in the freshwater crayfish *Cambarellus montezumae* (Cambaridae). *Rev Biol Trop.* 2015; 63(1):83-96.
52. Dixon D.R., Pruski A.M., Dixon L.R.J., Jha A.N. Marine invertebrate eco-genotoxicology: A methodological overview. *Mutagenesis.* 2002; 17: 495–507.
53. Duan C.Q., Hu B., Wang Z.H., Wen C.H., Yan S.Q., Jiang X.H., Wang D.K., Li Q., Liang X.F. *Tradescantia* bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. *Mutat Res.* 1999; 426:127–131.
54. Erismis U. C., Cigerci Ý. H., Konuk M. Evaluation of DNA damage in Eurasian Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) by Comet Assay for determination of possible pollution in the

- different lakes in Central Anatolia, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2013; 90:660–665.
55. Ersson C., Moller L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis.* 2011; 26:689–695.
  56. Fenech M., Morley A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985;147(1-2):29-36.
  57. Feng S., Kong Z., Wang X., Zhao L., Peng P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell.* *Chemosphere.* 2004; 56:457–463.
  58. Festa F., Cristaldi M., Ieradi L.A., Moreno S., Cozzi R. The Comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Doñana National Park. *Environ Res.* 2003;91(1):54-61.
  59. Fomin A., Paschke A., Arndt U. Assessment of the genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia*-stamen hair (Trad-SHM) and the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassays. *Mutat. Res.* 1999; 426:173–181.
  60. Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat Res.* 2009; 681:80–92
  61. Fuerhacker M. EU Water Framework Directive and Stockholm Convention. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2009; 16: 92–97.
  62. Gaivao I., Sierra L.M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. *Front Genet.* 2014; 5:304.
  63. Galindo B.A., Troilo G., Cólus I.M.S., Martinez C.B.R., Sofia S.H. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Water, air and soil pollution.* 2010; 212: 419-428.
  64. Gevorgyan G. A., Movsesyan H. S., Grigoryan K. V., Ghazaryan K. A. Environmental risks of heavy metal pollution of the soils around Kajaran town, Armenia. *Proc. of the Yerevan State Univ. Chemistry and Biology.* 2015; 2: 50–55.
  65. Gichner T., Veleminsky J. Monitoring the genotoxicity of soil extracts from two heavily polluted sites in Prague using the *Tradescantia* stamen hair and micronucleus (MNC) assays. *Mutat. Res.* 1999; 426:163–166.

66. Glei M., Habermann N., Osswald K., Seidel C., Persin C., Jahreis G., Pool-Zobel B.L. Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the Comet assay: a biomarker model. *Biomarkers*. 2005; 10:203–217.
67. Glei M., Kirmse A., Habermann N., Persin C., Pool-Zobel B.L. Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutr Cancer*. 2006a; 56:182–192.
68. Glei M., Klenow S., Sauer J., Wegewitz U., Richter K., Pool-Zobel B.L. Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res*. 2006b; 594:162–171.
69. Glei M., Latunde-Dada G.O., Klinder A., Becker T.W., Hermann U., Voigt K., Pool-Zobel B.L. Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. *Mutat Res*. 2002a; 519:151–161.
70. Glei M., Liegibel U.M., Ebert M.N., Bohm V., Pool-Zobel B.L. beta-Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002b; 179:65.
71. Glei M., Matuschek M., Steiner C., Bohm V., Persin C., Pool-Zobel B.L. Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicol In Vitro*. 2003; 17:723–729.
72. Glei M., Pool-Zobel B.L. The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20:295–300.
73. Glei M., Schaeferhenrich A., Claussen U., Kuechler A., Liehr T., Weise A., Marian B., Sendt W., Pool-Zobel B.L. Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes. *Toxicol Sci*. 2007; 96:279–284.
74. Glei M., Schneider T., Schlörmann W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol*. 2016;90(10):2315-36.
75. Gonzalez-Mille D. J., Espinosa-Reyes G., Rivero-Pérez N. E., Trejo-Acevedo A., Nava-Montes A. D., Ilizaliturri-Hernández C. A. Persistent Organochlorine Pollutants (POPs) and DNA damage in giant toads (*Rhinella marina*) from an industrial area at Coatzacoalcos, Mexico. *Water Air Soil Pollut*. 2013; 224:1–14.

76. González-Mille D. J., Ilizaliturri-Hernández C. A., Espinosa-Reyes G., Costilla Salazar R., Díaz-Barriga F., Ize-Lema I., et al. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*. 2010; 19:1238–1248.
77. Grant W.F., Lee H.G., Logan D.M., Salamone M.F. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Research*. 1992; 270(1):53–64.
78. Guilherme S., Gaivão I., Santos M. A., Pacheco M. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following shortterm exposure to Roundup R - a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*. 2010; 25:523–530.
79. Guimaraes E. T., Domingos M., Alves E. S., Caldini N., Lobo D. J. A., Lichtenfels A., Saldiva P. H. N. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ. Exp. Bot.* 2000; 44:1–8.
80. Haider T., Sommer R., Knasmuller S., Eckl P., Pribil W., Cabaj A. Kundi M. Genotoxic response of Austrian groundwater samples treated under standardized UV (254 nm)—disinfection conditions in a combination of three different bioassays. *Water Res.* 2002; 36: 25–32.
81. Hall R.J., Clark D.R. Jr. Responses of the iguanid lizard *Anolis carolinensis* to four organophosphorus pesticides. *Environ Pollut.* 1982; 28:45–52.
82. Harutyunyan H.A., Stepanyan I.E., Karagyan G.H., Kalashian M.Yu. Application of Comet Assay Method for Assessment of DNA Damage Provoking by Heavy Metal Pollution in Northern Armenia Conference Paper. Proceedings of the International Conference «Biological Diversity And Conservation Problems of the Fauna of the Caucasus – 2» Yerevan, Armenia. 2014.
83. Heddle J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res.* 1973;18(2):187-90.
84. Helma C., Eckl P., Gottmann E., Kassie F., Rödinger W., Steinkellner H., Windpassinger C., Schulte-Hermann R., Knasmuller S. Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. *Environ. Sci. Technol.* 1998; 32:1799–1805.

85. Hopkins W.A. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2000; 19:2391-2393.
86. Hovhannisyanyan G.G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Mol Cytogenet*. 2010; 3:17.
87. Huang D., Zhang Y., Wang Y., Xie Z., Ji W. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. *Mutat. Res*. 2007; 629:81–88.
88. Ichikawa S. In situ monitoring with *Tradescantia* around nuclear power plants. *Environ. Health Persp*. 1981; 37:145-164.
89. Ieradi L.A., Cristaldi M., Mascanzoni D., Cardarelli E., Grossi R., Campanella L. Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. *Environ. Pollut*. 1996; 92:323–328.
90. Ieradi L.A., Moreno S., Bolivar J.P., Cappai A., Di Benedetto A., Cristaldi M., Free-living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. *Environ. Pollut*. 1998; 102: 265–268.
91. Ieradi L.A., Zima J., Allegra F. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in Czech Republic. *Folia Zoologica*. 2003; 52: 57-66.
92. Isidori M., Ferrara M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A. In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere*. 2003; 52: 121–126.
93. Ismail M., Khan Q., Ali R., Ali T., Mobeen, A. Evaluation of the genotoxicity of chlorpyrifos in common indus valley toad, *Bufo stomaticus* using alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Agric. Sci*. 2014; 5:376–382.
94. Javed M., Ahmad I., Usmani N., Ahmad M. Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016;127:163-9.
95. Jha A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res*. 2004; 552:1–17.
96. Jha A. N. Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. *Mutat. Res*. 1998; 399:1–2.

97. Jha A. N., Cheung V. V., Foulkes M. E., Hill S. J., Depledge M. H. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryonal larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat. Res.* 2000; 464:213–228.
98. Jha A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 2008;23(3):207-21.
99. Jiang Y. G., Yu Z. D., Liu G. Z., Chen R. Z., Peng, G. Y. Genotoxicity of water samples from the scenic Lijiang river in the Guilin area, China, evaluated by *Tradescantia* bioassays. *Mutat. Res.* 1999; 426:137–141.
100. Khan A.T., Forester D.M., Mileke H.W. Heavy metal concentrations in two populations of crayfish. *Vet. Hum. Toxicol.* 1995; 37:426–428.
101. Kienzler A., Tronchère X., Devaux A., Bony, S. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified Comet Assay. *Toxicol. In Vitro.* 2012; 26:500–510.
102. Kiffe M., Christen P., Arni P. Characterization of cytotoxic and genotoxic effects of different compounds in CHO K5 cells with the comet assay (single-cell gel electrophoresis assay). *Mutat Res.* 2003;537(2):151-68.
103. Kim J. K., Shin H. S., Lee J. H., Lee J. J. Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay and by chemical analysis. *Mutat. Res.* 2003; 541:55–61.
104. Kinney C., Sylvester T., Destories A., Savoy K., Morris A., Ramelow G., Merchant M., Paulissen M. The Mediterranean Gecko as a sentinel to evaluate heavy metal exposure. *Herpetological Conservation and Biology.*2008; 3(2):247-253.
105. Kleinjans C.S., van Schooten F.J. Ecogenotoxicology: The evolving field. *Env. Toxicol. Pharmacol.* 2002;11: 173-179.
106. Klobucar G.I., Malev O., Šrut M., Štambuk A., Lorenzon S., Cvetković Ž., Ferrero E.A., Maguire I. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Chemosphere.*2012; 87(1):62-7.
107. Klumpp A., Ansel W., Klumpp G. et al. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. *Environ. Pollut.* 2006; 139:515–522.

108. Knasmuller S., Gottmann E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., God R., Kundi M. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 1998; 420:37–48.
109. Kopjar N., Mustafic P., Zanella D., Buj I., Caleta M., Marcic Z., Milic M., Dolenc Z., Mrakovcic M. Assessment of DNA integrity in erythrocytes of *Cobitis elongata* affected by water pollution: the alkaline comet assay study. *Folia Zool.* 2008; 57:120–130.
110. Kosmehl T., Krebs F., Manz W., Erdinger, L., Braunbeck, T., Hollert, H. Comparative genotoxicity testing of Rhine River sediment extracts using the comet assay with permanent fish cell lines (RTG-2 and RTL-W1) and the Ames test. *Journal of Soils and Sediments.* 2004; 4(2): 84-94.
111. Kuklina I., Kouba A., Buric M., Horka I., Duris Z., Kozak P. Accumulation of heavy metals in crayfish and fish from selected Czech reservoirs. *BioMed Research International.* 2014;1-9.
112. Lah B., Vidic T., Glasencnik E., Cepeljnik T., Gorjanc G., Marinsek-Logar R. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. *Environ. Monit. Assess.* 2008; 139:107–118.
113. Lemos D.S., Mantovani M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2005; 19:197-201.
114. Linhartova P., Gazo I., Shaliutina-Kolesova A., Hulak M., Kaspar V. Effects of tetrabrombisphenol A on DNA integrity, oxidative stress, and sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa quality variables. *Environ. Toxicol.* 2014; 1-11.
115. Liu Y., Zhang Y., Liu J., Huang, D. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. *Aquat. Toxicol.* 2006; 78:21–26.
116. Lourenço J., Pereira R., Gonçalves F., Mendo S. Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. *Sci. Total Environ.* 2013; 443:673–680.
117. Ma T.H., Cabrera G.L., Cebulska-Wasilewska A., Cabrera G.L., Loarca F., Vandenberg A.L., Salamone M.F. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutat Res.* 1994a; 310:211–220.
118. Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vandenberg A.L., Salamone M.F. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat Res.* 1994b; 310:221–230.

119. Majer B. J., Tscherko D., Paschke A., Wennrich R., Kundi M., Kandeler E., Knasmüller, S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutat. Res.* 2002; 515:111–124.
120. Malev O., Srut M., Maguire I., Stambuk A., Ferrero E.A., Lorenzon S., Klobucar G.I. Genotoxic, Physiological and Immunological Effects Caused by Temperature Increase, Air Exposure or Food Deprivation in Freshwater Crayfish *Astacus Leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2010; 152(4):433–443.
121. Maluszynska J., Juchimiuk J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2005; 56(2):177–184.
122. Marcon A. E., Ferreira M. D. D., de Moura M. F. V. et al. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. *Chemosphere*. 2010; 81(6):773–780.
123. Mariani R. L., Jorge M. P. M., Pereira S. S., Melione L. P., Carvalho- Oliveira R., Ma T. H., Saldiva P. H. N. Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia* and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: a preliminary study in Sao Jose dos Campos, Brazil. *Environ. Pollut.* 2009; 157:1767–1770.
124. Martins M., Costa P.M., Raimundo J., Vale C., Ferreira A.M., Costa M.H. Impact of remobilized contaminants in *Mytilus edulis* during dredging operations in a harbour area: bioaccumulation and biomarker responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012; 85:96–103.
125. Maselli V., Polese G., Rippa D., Ligrone R., Kumar Rastogi R., Fulgione D. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring provinces. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010; 73:1525–1529.
126. Mateos S., Daza P., Domínguez I., Cárdenas J.A., Cortés F. Genotoxicity detected in wild mice living in a highly polluted wetland area in south western Spain. *Environ Pollut.* 2008;153(3):590-593.
127. Matson C.L., Palatnikov G., Islamzadeh A., McDonald T.J., Autenrieth R.L., Donnelly K.C., Bickham J.W. Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting sites in Azerbaijan. *Ecotoxicology*. 2005; 14:513–525.
128. Meireles J., Rocha R., Neto A. C., Cerqueira E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN). *Mutat. Res.* 2009; 675:46–50.

129. Mekkawy I. A., Mahmoud U. M., Osman A. G., Sayed A.D. Effects of ultraviolet A on the activity of two metabolic enzymes, DNA damage and lipid peroxidation during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Fish Physiol. Biochem.* 2010; 36:605–626.
130. Metcheva R., Teodorova S., Topashka-Ancheva M. A comparative analysis of the heavy metal and toxic elements loading indicated by small mammals in different Bulgarian regions. *Acta Zoologica Bulgaric.* 2001; 53: 61-80.
131. Metcheva R., Topashka-Ancheva M. Investigations on the bioaccumulation and distribution of heavy metals and chromosome patterns in the monitor species yellow-necked wood mice (*Apodemus flavicollis*) from Rila National park. *Contrib. Zoogeogr. Ecol. East. Mediterr. Region.* 1999; 1: 31-36.
132. Meza-Joya F. L., Ramírez-Pinilla M. P., Fuentes-Lorenzo J. L. Toxic, cytotoxic, and genotoxic effects of a glyphosate formulation (Roundup R SL– Cosmoflux R 411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*. *Environ. Mol. Mutagen.* 2013; 54:362-373.
133. Michailova P., Atanassov N., Ilkova J., Chassovnikarova T., Duran M., Karadurmus E. Genome response of model invertebrates and vertebrates species to stress agents in the environment. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2010; 24: 675-679.
134. Michel C., Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Palais F., Geffard A., Vincent-Hubert F. Seasonal and PAH impact on DNA strand-break levels in gills of transplanted zebra mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013; 92:18–26.
135. Mielli A. C., Matta M. E., Nersesyan A., Saldiva P. H., Umbuzeiro G. A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2009; 672:51–54.
136. Miloshev G., Mihaylov I., Anachkova B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. *Mutat Res.* 2002; 513:69–74.
137. Minouflet M., Ayrault S., Badot P. M., Cotelle S., Ferard J. F. Assessment of the genotoxicity of <sup>137</sup>Cs radiation using *Vicia* micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. *J. Environ. Radioact.* 2005; 81:143–153.

138. Misik M., Burke I.T., Reismuller M., Pichler C., Rainer B., Misikova K., Mayes W.M., Knasmueller S. Red mud a byproduct of aluminum production contains soluble vanadium that causes genotoxic and cytotoxic effects in higher plants. *Sci Total Environ.* 2014; 493:883–890.
139. Misik M., Ma T.H., Nersesyan A., Monarca S., Kim J.K., Knasmueller S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. *Mutagenesis.* 2011; 26:215–221.
140. Misik M., Micieta, K., Solenska, M., Misikova K., Pisarcikova H., Knasmuller S. In situ bio-monitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in an eastern European city. *Environ. Pollut.* 2007; 145: 459–466.
141. Mitchelmore C.L., Rower C.L., Place A.R. Tools for assessing contaminant exposure and effects in reptiles. In: Gardner, S.C., Oberdorster, E. (Eds.). *Toxicology of Reptiles. New perspective: Toxicology and the Environment.* Taylor & Francis Group, Florida. 2005; 63–122.
142. Mitkovska V., Chassovnikarova T., Atanasov N., Dimitrov H. DNA damage detected by Comet assay in *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) from Strandzha Natural Park. *Acta zool. bulg.* 2012b; 4: 155-158.
143. Mitkovska V., Chassovnikarova T., Atanasov N., Dimitrov H. Environmental genotoxicity evaluation using a micronucleus test and frequency of chromosome aberrations in free-living small rodents *J. BioSci. Biotech.* 2012a; 1(1): 67-71.
144. Mohamed H.R., Hussien N.A. Genotoxicity studies of titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>NPs) in the brain of mice. *Scientifica.* 2016; 1-7.
145. Mohammed K. B., Ma T. H. *Tradescantia*-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutat. Res.* 1999; 426, 193–199.
146. Monarca S., Feretti D., Collivignarelli C., Guzzella L., Zerbini I., Bertanza G., Pedrazzani, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Res.* 2000. 34:4261-4269.
147. Monarca S., Feretti D., Zerbini I., Alberti A., Zani C., Resola S., Gelatti U., Nardi G. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environ. Res.* 2002; 88:64–69.

148. Monarca S., Rizzoni M., Gustavino B., Zani C., Alberti A., Feretti D., Zerbini I. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003; 41:353–359.
149. Monarca S., Zanardini A., Feretti D., Dalmiglio A., Falistocco E., Manica P., Nardi, G. Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests. *Water Res.* 1998; 32:2689–2695.
150. Moore M. N., Depledge M. N., Readman J. W., Leonard D. R. P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 2004; 552:247–268.
151. Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Ferrier V., Devaux A. Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the Comet Assay and the micronucleus test. *Environ. Toxicol.* 2006a; 21:264–277.
152. Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Ferrier V., Devaux A. Comparative study of the Comet Assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian Comet Assay. *Environ. Toxicol.* 2005a; 20:74–84.
153. Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Jourdain M. J., Ferrier V., Devaux A. Biomonitoring of the genotoxic potential of draining water from dredged sediments, using the comet and micronucleus tests on Amphibian (*Xenopus Laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox R and Ames Tests). *J. Toxicol. Environ. Health Part A.* 2005b; 68:811–832.
154. Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Jourdain M. J., Ferrier V., Triffault G. et al. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox R and Ames tests). *Sci. Total Environ.* 2006b; 355:232–246.
155. Munjal U., Scharlau D., Gleis M. Gut fermentation products of inulin-type fructans modulate the expression of xenobiotic-metabolising enzymes in human colonic tumour cells. *Anticancer Res.* 2012; 32:5379–5386.
156. Nacci D.E., Cayula S., Jackim E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat Toxicol.* 1996; 35:197–210.

157. Nehls S., Segner H. Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for in vitro genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environ Toxicol Chem.* 2005; 24(8):2078-87.
158. Nehls S., Segner H. Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. *Environ Toxicol.* 2001;16(4):321-9.
159. Obiakor M.O., Okonkwo J.C., Ezenonyeiaku C.D., Ezenwelu C.O. Genotoxicology: Single and Joint Action of Copper and Zinc to *Synodontis clarias* and *Tilapia nilotica*. *Appl. Sci. Environ. Manage.* 2010; 14:59-64.
160. Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res.* 2004; 567:109–149.
161. Olive P.L., Banáth J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc.* 2006;1(1):23-9.
162. Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 1990; 122(1):86–94.
163. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123:291–298.
164. Oyekunle J.A.O., Adekunle A.S., Ogunfowokan A.O., Akanni M.S., Coker O.S. Agama lizard: A potential biomarker of environmental heavy metal pollution assessment. *African Journal of Environmental Science and Technology.* 2012; 12(6):458-463.
165. Palanikumar L., Kumaraguru A.K., Ramakritinan C. M. Biochemical and genotoxic response of naphthalene to fingerlings of milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology.* 2013; 22:1111–1122.
166. Pandrangi R., Petras M., Ralph S., Vrzoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen.* 1995; 26:345–356.
167. Pereira S.M., Fernández-Tajes J., Rábade T., Flórez-Barrós F., Laffon B., Méndez J. Comparison between two bivalve species as tools for the assessment of pollution levels in an estuarine environment. *J. Toxicol. Environ. Health Part A.* 2011; 74:1020–1029.
168. Peycheva E., Alexandrova R., Miloshev G. Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity. *LWT Food Sci Technol.* 2014; 59:510–517.

169. Poletta G.L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D. Caiman latirostris (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat. Res.* 2008; 650:202–209.
170. Pra D., Lau A.H., Knakiewicz T., Carneiro F.R., Erdtmann B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutat Res.* 2005; 585(1-2):79-85.
171. Prajapati S. K., Tripathi B. D. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Environ. Int.* 2008; 34: 1092–1096.
172. Rajaguru P., Kalpana R., Hema A., Suba S., Baskarathupathi B., Kumar P. A. et al. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet Assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001; 38, 316–322.
173. Rajaguru P., Suba S., Palanivel M., Kalaiselvi K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003; 41:85-91.
174. Ralph S., Petras M. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Mutat. Res.* 1998a; 413: 235–250.
175. Ralph S., Petras M. Comparison of sensitivity to methyl methanesulphonate among tadpole developmental stages using the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998b; 31:374–382.
176. Ralph S., Petras M. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 1997; 29: 418–430.
177. Ralph S., Petras M., Pandrangi R., Vrzoc M. Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ. Mol. Mutagen.* 1996; 28: 112–120.
178. Rocco L., Frenzilli G., Fusco D., Peluso C., Stingo V. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010; 73:1530–1536.

179. Rodrigues G. S., Pimentel D., Weinstein L. H. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I—*Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat. Res.* 1998; 412: 235–244.
180. Rodriguez-Cea A., Ayllon F., Garcia-Vazquez E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003; 56:442–448.
181. Rojas E., Lorenzo Y., Haug K., Nicolaissen B., Valverde M. Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. *Front Genet.* 2014; 5:386.
182. Sánchez-Chardi A., Marques C.C., Gabriel S.I., Capela-Silva F., Cabrita A.S., López-Fuster M.J., Nadal J., Mathias M.L. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as bi-omarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environ Pollut.* 2008; 156(3):1332-9.
183. Sánchez-Chardi A., Nadal J. Bioaccumulation of metals and effects of landfill pollution in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere.* 2007a; 68(4):703-11.
184. Sánchez-Chardi A., Peñarroja-Matutano C., Ribeiro C.A., Nadal J. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemo-sphere.* 2007b; 70(1):101-9.
185. Santos R., Palos-Ladeiro M., Besnard A., Porcher J. M., Bony S., Sanchez W. et al. Relationship between DNA damage in sperm after *ex vivo* exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. *Reprod. Toxicol.* 2013; 36:6–11.
186. Sasaki Y.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ishibashi S., Tsuda S., Matsusaka N., Asano N., Saotome K., Sofuni 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; 393:133–139.
187. Savoia E. J. L., Domingos M., Guimaraes E. T., Brumati F., Saldiva P. H. N. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009; 72:255–260.

188. Scalon M.C., Rechenmacher C., Siebel A.M., Kayser M.L., Rodrigues M.T., Maluf S.W., Rodrigues M.A., Silva L.B. Genotoxic potential and physicochemical parameters of Sinos River, southern Brazil. *Sci World J.* 2013.
189. Schaumburg L.G. , Poletta G.L. , Siroski P.A. , Mudry M.D. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata) *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2012; 84:99-103.
190. Schaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D. Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*): the effect of age. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014; 766:5-9.
191. Schaumburg L.G., Siroski P.A., Poletta G.L., Mudry M.D. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pestic Biochem Physiol.* 2016; 130:71-8.
192. Schaumburg L.G., Siroski P.A., Poletta G.L., MudryMD. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pestic Biochem Physiol.* 2016; 130:71-8.
193. Scheirs J., De Coen A., Covaci A., Beernaert J., Kayawe V.M., Caturla M., De Wolf H., Baert P., Van Oostveldt P., Verhagen R., Blust R., De Coen W. Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure-, age-, and gender-related effects. *Environ Toxicol Chem.* 2006; 25(8):2154-62.
194. Schiedek D., Broeg K., Barsiene J. et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 2006; 53:387–405.
195. Schilderman P.A.E.L., Moonen E.J.C., Maas L.M., Welle I., Kleinjans J.C.S. Use of Crayfish in Biomonitoring Studies of Environmental Pollution of the River Meuse. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 1999; 44(3):241–252.
196. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975; 31(1):9-15.
197. Sebbio C., Carere C., Nascetti G., Bellisario B., Mosesso P. et al. Interspecies variation in DNA damage induced by pollution. *Curr. Zool.* 2014; 60: 308–321.
198. Shugart L., Theodorakis C. Environmental genotoxicity: Probing the underlying mechanisms. *Environ. Health Persp.* 1994; 102 (12): 13 –17.

199. Shugart L., Theodorakis C. New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy*. 1998; 11: 119-127.
200. Silva de Assis H. C., da Silva C. A., Oba E. T., Pamplona J. H., Mela M., Doria H. B., et al. Hematologic and hepatic responses of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* after saxitoxin exposure. *Toxicon*. 2013; 66:25–30.
201. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 1988; 175:184–191.
202. Solenska M., Micieta K., Misik M. Plant bioassays for an in situ monitoring of air near an industrial area and a municipal solid waste-Zilina (Slovakia). *Environ. Monit. Assess*. 2006; 115:499–508.
203. Sparling D.W., Matson C., Bickham J., Doelling-Brown P. Toxicity of glyphosate as Glypro and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. *Environ Toxicol Chem*. 2006; 25:2768–2774.
204. Srut M., Stambuk A., Pavlica M., Klobucar G. I. Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for in situ assessment of pollution related genotoxicity. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. 2010; 61:29–36.
205. Steinkellner H., K. Mun-Sik, C. Helma, S. Ecker, T.H. Ma, M. Kundi, S. Knasmuller, Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays, *Environ. Mol. Mutagen*. 1998; 31:183–191.
206. Steinkellner H., Kassie F., Knasmuller S. *Tradescantia* micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. *Mutat. Res*. 1999; 426:113–116.
207. Stepanyan I.E., Karagyan G.H., Kalashian M.Yu., Harutyunyan H.A. Identification of the influence of heavy metal pollution on cytogenetic and molecular features of frog *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura) and rock lizards *Darevskia armeniaca* and *D. nairensis* (Reptilia, Sauria) in Lori province of Armenia. Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов Материалы III Международной конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского (7–9 октября 2015 г., Минск, Беларусь)
208. Stiazhkina E. V., Obvintseva N. A., Shaposhnikova I. A., Triapitsyna G. A., Stukalov P. M., Priakhin E. A. Analysis of DNA damage/repair level in *Rutilus rutilus* L. from reservoirs of

- the Techa River cascade with different levels of radioactive pollution. *Radiats. Biol. Radioecol.* 2012; 52:198–206.
209. Stopka P., Macdonald D. W. The market effect in the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*: selling information on reproductive status. *Ethology.* 1999; 105: 969-982.
  210. Strunjak-Perovic I., Lisicic D., Coz-Rakovac R., Topic Popovic N., Jada M., Benkovi V., Tadic Z. Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. *Ecotoxicology.* 2010; 19:1460–1465.
  211. Sunjog K., Gačić Z., Kolarević S., Višnjić-Jeftić Ž., Jarić I., Knežević-Vukčević J., Vuković-Gačić B., Lenhardt M. Heavy metal accumulation and the genotoxicity in barbel (*Barbus barbus*) as indicators of the Danube river pollution. *ScientificWorldJournal.* 2012a; 2012:351074.
  212. Sunjog K., Kolarević S., Gačić Z., Mićković B., Nikčević M., Knežević-Vukčević J., Lenhardt M., Vuković-Gačić B. Ecogenotoxicity analysis with Comet Assay in different tissues of chub (*Squalius cephalus* L.1758). In *Proceedings of the BALWOIS Conference, Ohrid, Macedonia.* 2012b; 1–5.
  213. Taju G., Abdul Majeed S., Nambi K. S., Sahul Hameed A. S. In vitro assay for the toxicity of silver nanoparticles using heart and gill cell lines of *Catla catla* and gill cell line of *Labeo rohita*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2014; 161:41–52.
  214. Talent L.G., Dumont J.N., Bantle J.A., Janz D.M., Talent S.G. Evaluation of western fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) and eastern fence lizards (*Sceloporus undulates*) as laboratory reptile models for toxicological investigations. *Environ Toxicol Chem.* 2002; 21(5):899–905.
  215. Talmage S.S., Walton B.T. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1991; 119(2):47-145.
  216. Tanzarella C., Degrassi F., Cristaldi M., Moreno S., Lascialfari A., Chiuchiarelli G., Ieradi, L.A. Genotoxic damage in free-living Algerian mouse (*Mus spretus*) after the Coto Doñana ecological disaster. *Environmental Pollution.* 2001; 115:43-48.
  217. Tapisso J.T., Marques C.C., Mathias Mda L., Ramalhinho Mda G. Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutat Res.* 2009; 678(1):59-64.

218. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35:206–221.
219. Topashka-Ancheva M., Metcheva R., Teodorova S. A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: Chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2003; 54 (2): 176-187.
220. Udroi I., Cristaldi M., Ieradi LA, Tanzarella C., Moreno S. Biomonitoring of Doñana National Park using the Algerian Mouse (*Mus Spretus*) as a sentinel species. *Fresenius Environmental Bulletin.* 2008;17(9b) : 1519 – 1525.
221. Valencia L. C., García A., Ramírez-Pinilla M. P., Fuentes J. L. Estimates of DNA damage by the Comet Assay in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). *Genet. Mol. Biol.* 2011; 34:681–688.
222. Vasseur P., Bonnard M., Ecogenotoxicology in earthworms: a review. *Curr. Zool.* 2014; 60: 255–272.
223. Velma V., Tchounwou P. B. Oxidative stress and DNA damage induced by chromium in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Biomark. Insights.* 2013. 8: 43–51.
224. Venier P., Maron S., Canova S. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussel exposed to bezon(a) pyrene. *Mutat. Res.*1997; 390:33–44.
225. Ventura L., Giovannini A., Savio M., Dona M., Macovei A., Buttafava A., Carbonera D., Balestrazzi A. Single cell gel electrophoresis (Comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere.* 2013; 92:1–9.
226. Vieira M.C., Torronteras R., Córdoba F., Canalejo A. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012; 78:212-217.
227. Villarini M., Fatigoni C., Dominici L., Maestri S., Ederli L., Pasqualini S., Monarca S., Moretti M. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants using two in situ plant bioassays. *Environ. Pollut.* 2009; 157:3354–3356.
228. Villarini M., Moretti M., Damiani E., Greci L., Santroni A.M., Fedeli D., Falcioni G. Detection of DNA damage in stressed trout nucleated erythrocytes using the comet assay: protection by nitroxide radicals. *Free Radical Biol Med.*1998; 24:1310 –1315.

229. Vuori K.M. Direct and indirect effects of iron on river ecosystems. Finnish zoological and botanical Publishing board Fennici. 1995; 32:317-329.
230. Wang M.Z., Jia X.Y. Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of the frog *Rana nigromaculata*. *Ecotoxicology*. 2009; 18:94–99.
231. Wassom J. S. Merging mutation research with genomics. *Mutat. Res. Forum*. 1996; 1:2–4.
232. Wurgler F. E., Krammers P. G. N. Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis*. 1992; 7: 321–327.
233. Xu Z. D., Ma T. H. Clastogenicity of formaldehyde fumes and X-rays evaluated by the *Tradescantia*-micronucleus assay. *Environ. Exp. Bot.* 1998; 39:169–175.
234. Yang G. *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. *Mutat. Res.* 1999; 426:155–157.
235. Yin X. H., Li S. N., Zhang L., Zhu G. N., Zhuang H. S. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the Comet Assay. *Ecotoxicology*. 2008; 17: 280–286.
236. Yin X., Zhu G., Li X. B., Liu S. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet Assay and micronucleus test. *Mutat. Res.* 2009; 680:2–6.
237. Zeng D. M., Li Y., Lin, Q. Q. Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People’s Republic of China. *Mutat. Res.* 1999; 426:159–161.
238. Zhang H., Cai C., Shi C., Cao H., Han Z., Jia, X. Cadmium-induced oxidative stress and apoptosis in the testes of frog *Rana limnocharis*. *Aquat. Toxicol.* 2012; 122–123:67–74.
239. Zocche J. J., Damiani A. P., Hainzenreder G., Mendonça R. Á., Peres P. B., Santos C. E., et al. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 36:194–201.
240. 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.
241. Атоянц А.Л. Традесканция как тест-объект генетического мониторинга средовых факторов в Армении. автореф. дис. канд. биол. наук. – Ереван, 1998, 20 с.

242. Бадаева Т. Н. Изучение структурной организации и полиморфизма микросателлитных локусов у партеногенетической ящерицы *Darevskia unisexualis*. автореф. дис. канд. биол. наук. – Москва, 2008. 24 с.
243. Даниелян К., Габриелян Б., Минасян С., Чилингарян Л., Мелконян Г., Караханян А., Тозалакян П., Ванян А., Пирумян Г., Гукасян Э., Сарксян Л. Интегральная оценка экологического состояния озера Севан. Ассоциация «За УЧР». UNEPCom Доклад, Ереван 2011; 1-42.
244. Дробот Г.П., Ремизова О.С. Использование гематологических показателей *Lacerta agilis* L. для оценки антропогенно нарушенных территорий. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012; 14(8):1887-1890.
245. Колмакова Т.С., Белик С.Н., Моргуль Е.В., Севрюков А.В. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей. Методические рекомендации. – Ростов на Дону: Изд-во Рост ГМУ, 2013; 31 с.
246. Ляшенко О.А, Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учебное пособие. СПб ГТУРП. - СПб., 2012. – 67 с.
247. Матевосян М.Б. Оценка и мониторинг генотоксичности вод некоторых рек Армении автореф. дис. канд. биол. наук. – Ереван, 2006. 22 с.
248. Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И. и др. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование.; под ред. Мелеховой, О.П. и Егоровой, Е. И.: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. - М.: Издательский центр "Академия", 2007. - 288 с.
249. Осипова Р. Г., Шевченко В. А. Использование традесканции (клоны 02 и 4430) в исследованиях по радиационному и химическому мутагенезу. Журнал Общей Биологии. 1984. Т. XLV(2):226–232.
250. Сорочинская У.Б. и Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды. ОНКОЛОГИЯ, 2008; 10(3):303—309.
251. Якунина И.В. Методы и приборы контроля окружающей среды. Экологический мониторинг: учебное пособие. И.В. Якунина, Н.С. Попов. - Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2009. - 188 с.