

УДК 575.22;502.4

ОЦЕНКА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ НАЗЕМНЫХ МОЛЛЮСКОВ (НА ОСНОВЕ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ)

© 2014 г. Э. А. Снегин

Научно-исследовательская лаборатория популяционной генетики и генотоксикологии
Белгородского государственного национального исследовательского университета

308014 Белгород, ул. Победы, д. 85

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 11.12.13 г.

Окончательный вариант получен 14.01.14 г.

Методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) была оценена степень повреждения ядерной ДНК в популяциях наземных моллюсков *Bradybaena fruticum* Müll., *Chondrula tridens* Müll., *Cerpea vindobonensis* Fer. и *Stenomphalia ravergieri* Fer., обитающих в условиях лесостепного ландшафта юга Среднерусской возвышенности. Выявлены свидетельства наличия различий по исследуемым показателям. Отмечается возрастная динамика степени повреждения генетического аппарата. Обсуждаются возможные причины выявленных различий.

Ключевые слова: наземные моллюски, повреждение ДНК, метод ДНК-комет.

DOI: 10.7868/S0475145014030069

ВВЕДЕНИЕ

Различные техногенные факторы и химические агенты, которые действуют на ДНК живых организмов, могут исказить механизм передачи наследственной информации. Это, как известно, может привести к серьезным последствиям в нормальном функционировании существующих форм органического мира, включая и человека.

Из имеющегося в арсенале современных тест-систем для оценки уровня цитогенетической стабильности в условиях влияния различных ксенобиотиков весьма чувствительным является метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток, получивший сокращенное название метод ДНК-комет (Comet assay) (Ostling, Johanson, 1984; Тронов, Пелевина, 1996; Olive, Banath, 2006; Сорочинская, Михайленко, 2008; Dhawan, Anderson, 2009). В подавляющем большинстве случаев этот подход используется в лабораторных экспериментах в условиях *in vitro* и *in vivo*. Но, постепенно появляются сведения о применении этого метода для определения степени мутагенной нагрузки в различных ландшафтах (Shugart, 2000; Regoli et al., 2004; Mitchelmore C.L. et al., 2004; Слободскова и др., 2011). В этой связи возникает вопрос о приемлемых организмах-биоиндикаторах, способных стать объектами экотоксикологического мониторинга. В качестве таковых мы

предлагаем использовать наземных брюхоногих моллюсков.

Цель настоящей работы состояла в оценке уровня цитогенетической стабильности природных популяций животных юга Среднерусской возвышенности путем изучения реакции организмов на генотоксичные факторы среды методом ДНК-комет. В данном исследовании были задействованы аборигенные для района исследования виды наземных моллюсков: *Bradybaena (Fruticicola) fruticum* Müll. (кустарниковая улитка), *Chondrula tridens* Müll., (улитка трехзубая) и *Cerpea vindobonensis* Fer. (улитка австрийская). Выбор этих организмов обусловлен несколькими причинами.

Во-первых, названные виды, обладая ярко выраженным полиморфизмом конхиологических и биохимических признаков, давно используются в качестве биоиндикаторов антропогенного воздействия на биоценозы в различных ландшафтах (Матекин, 1950; Макеева и др. 2005; Крамаренко и др., 2007; Снегин 2010, 2011а, б).

Во-вторых, в местах обитания они образуют многочисленные колонии и широко распространены на европейском континенте, что позволяет получить репрезентативный материал.

В-третьих, кустарниковая и австрийская улитки являются относительно долгоживущими (до

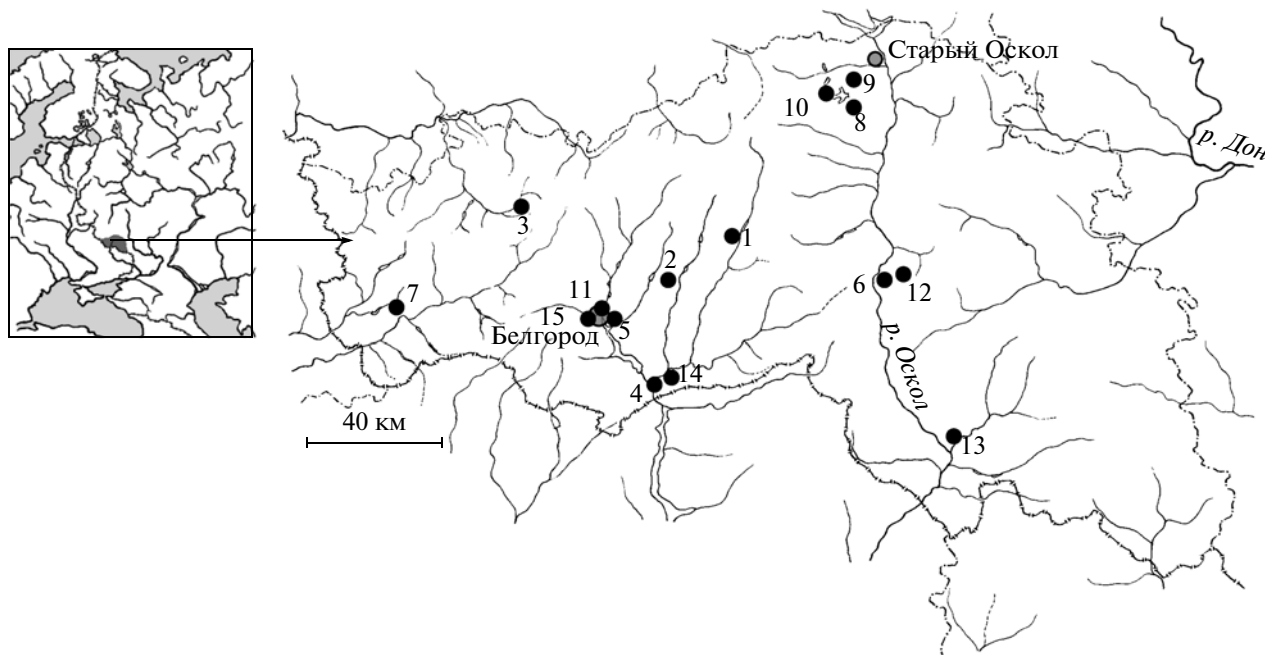


Рис. 1. Пункты сбора моллюсков.

5 лет) и малоподвижными животными, привязанными своей биологией к определенной растительности и почвам. Все это способствует накоплению в их теле различных поллютантов, включая и генотоксичные компоненты.

Кроме того, нами был проведен анализ одной колонии адвентивной северокавказской улитки *Stenomphalia ravergieri* Fer.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводились на территории юга Среднерусской возвышенности (Белгородская область) в летний сезон 2011 г. Улитки собирались вручную в местах обитания. Для сбора *Ch. tridens* применялся метод кошени сачком. Из каждой популяции случайным образом отбиралось по десять особей для лабораторных исследований. Анализировались в основном половозрелые моллюски, закончившие рост, о чем свидетельствовал отворот устья на раковине. Всего было исследовано 150 особей из пятнадцати пунктов (рис. 1), описание которых приводится в табл. 1.

Метод ДНК-комет. Стоит отметить, что одним из ключевых моментов использования этого метода для анализа природных популяций, на наш взгляд, является время, прошедшее с момента сбора животных, до проведения собственно анализа. Судя по публикациям, как, например, в работе В.В. Слободской и др. (2011), авторы выдерживали животных в лаборатории после сбора до двух суток. Однако, по нашим данным, если

анализируемые организмы находятся вне своей среды обитания более суток¹, то за это время происходит, либо полная репарация поврежденной ДНК (если таковая была), либо удаление из организма клеток с сильно разрушенной ДНК и находящихся в состоянии апоптоза. Эти факторы могут сильно исказить реальную картину. Поэтому мы считаем, что анализ необходимо проводить как можно быстрее после изъятия организмов, используя при этом полевые лаборатории. Полагаем также, что если проведение анализа затруднено (например, из-за пространственной удаленности лаборатории), то для транспортировки животных необходимо использовать матерчатые мешки, или стеклянные банки, куда помещаются кусочки почвы, листовый опад и наземные части кормовых растений, взятых из обследуемого биотопа. Транспортировку улиток следует проводить в прохладном месте.

В наших исследованиях животные анализировались в день сбора. Для анализа использовали ткань гепатопанкреаса. Мацерация проходила в фосфато-солевом буфере (pH 7.5) содержащем 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% ДМСО при температуре +4°C. Клеточные суспензии в составе легкоплавкой агарозы наносили на предметные стекла

¹ В ходе лабораторных экспериментов, проводимых в условиях *in vivo*, нами было зафиксировано, что если с момента воздействия мутагена (метилметансульфонат) проходит более 20-ти часов, то количество отмечаемых ДНК-комет резко снижается.

Таблица 1. Описание пунктов сбора

Пункт	Описание биотопа	Координаты
1	Памятник природы “Ясный колодец”, пойма р. Короча, окрестности г. Короча. Опушка черноольшанника	50°49'34.23" с.ш. 37°12'34.24" в.д.
2	Пойма реки Корень, окрестности пос. Алексеевка (Корочанский район). Заросли ивы	50°45'19.01" с.ш. 37°01'30.91" в.д.
3	Пойма р. Пена, окрестности пос. Сырцево (Ивнянский район). Заросли ивы и клена	50°53'48.79" с.ш. 36°15'32.43" в.д.
4	Пойма р. Нежеголь, территория г. Шебекино. Ивовый лес	50°24'32.93" с.ш. 36°52'38.38" в.д.
5	Пойма р. Северский Донец, окрестности г. Белгород. Заросли ивы и клена	50°36'38.40" с.ш. 36°37'19.19" в.д.
6	Заповедный участок “Стенки Изгорья”, долина р. Оскол, окраина черноольшанника (Новооскольский район)	50°41'22.60" с.ш. 37°49'12.67" в.д.
7	Пойма р. Ворскла, территория пос. Борисовка, под автомобильным мостом	50°36'32.25" с.ш. 36°00'21.33" в.д.
8	Пойма р. Осколец, окрестности д. Стойло, территория Стойленского ГОК (Губкинский район), заросли ивы	51°17'24.75" с.ш. 37°44'05.57" в.д.
9	Рекультивированные отвалы Стойленского ГОК (точка 1, Губкинский район)	51°17'18.18" с.ш. 37°40'56.29" в.д.
10	Рекультивированные отвалы Стойленского ГОК (точка 2, Губкинский район)	51°17'04.37" с.ш. 37°42'59.01" в.д.
11	г. Белгород, газон возле старого корпуса БелГУ, посадки каштанов и елей	50°37'16.58" с.ш. 36°34'36.25" в.д.
12	Заповедный участок “Стенки Изгорья”, меловой склон на северной окраине, долина р. Оскол (Новооскольский район)	50°41'24.42" с.ш. 37°49'34.22" в.д.
13	Долина р. Валуй, подножие мелового склона, окрестности г. Валуйки, рядом с автомобильной трассой	50°13'24.38" с.ш. 38°00'34.61" в.д.
14	Памятник природы “Бекарюковский бор”, пойма р. Нежеголь (Шебекинский район), посадки клена и меловой склон вблизи автомобильной трассы	50°25'43.87" с.ш. 37°04'12.07" в.д.
15	г. Белгород, заросли кустарников у обочины трассы Москва–Семферополь	50°35'24.14" с.ш. 36°34'13.35" в.д.

с агарозной подложкой при температуре +42°C. Лизис белков проходил два часа при температуре +4°C (лизирующий буфер: 10 mM Tris-HCl (pH 10), 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1% Triton X-100 и 10% ДМСО). Электрофорез проводили в темном помещении, применяя нейтральную версию метода с использованием трис-ЭДТА-боратного буфера (pH 8.9; 20 мин; 1 в/см). Фиксированные спиртом и высушенные препараты окрашивали красителем SYBR Green I. Анализ изображений проводился на эпифлуоресцентном микроскопе. Данные обрабатывались при помощи программы CometScoreTM v. 1.5². Ядра ранжировались по четырем стадиям разруше-

² http://www.autocomet.com/products_cometscore.php

ния ДНК. На каждом препарате учитывалось не менее 100 ядер (рис. 2).

Степень поврежденности ДНК мы оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса, который иногда выражается как индекс “ДНК-комет” (ИДК), по формуле:

$$\text{ИДК} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \sum,$$

где n_0 – n_4 – число “ДНК-комет” каждого типа, \sum – сумма подсчитанных “ДНК-комет” (Struwe et al., 2007).

Кроме того, для расчетов был использован непараметрический критерий Даннета (“% ДНК в хвосте” – % DNA_t и “Момент хвоста” – tM , (Olive et al., 1990; Chaubey, 2005; Francesconi et al., 2001),

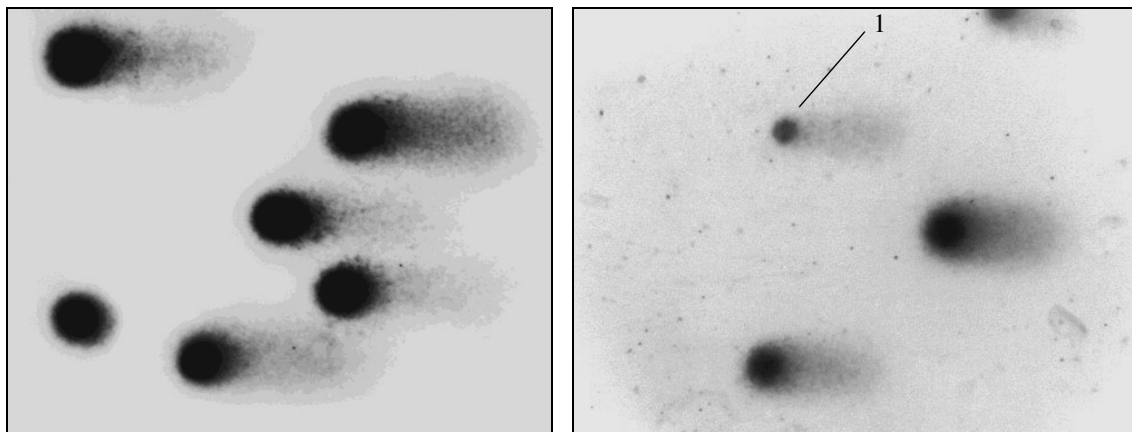


Рис. 2. Изображение ДНК-комет клеток гепатопанкреаса *Br. fruticum* (на фотографии видны ядра на различных стадиях разрушения, 1 – ядро клетки в состоянии апоптоза).

а так же высчитывался процент клеток, находившихся в состоянии апоптоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно проведенным ранее исследованиям в изучаемых популяциях моллюсков мы наблюдали уменьшение фенотипического и аллельного разнообразия, а также сокращение количества комбинаций и увеличение коэффициента инбридинга (Снегин 2010, 2011а, б; Снегин и др., 2012). По нашим данным, такие генетико-эрозийные процессы вызваны крайней расчлененностью видового населения моллюсков в условиях лесостепного и степного ландшафта юга Среднерусской возвышенности. Не последнюю роль в этом играет также территориально механическая изоляция популяций, являющаяся следствием воздействия человека.

Вместе с тем, пятнадцатилетние наблюдения, например, за популяциями *Br. fruticum* и *Ch. tridens*, где ранее была зафиксирована полная гомозиготность по ряду локусов, не выявили сокращения численности в этих группах и каких либо других признаков угнетения. Такая картина наблюдалась также в районах воздействия промышленных предприятий, где помимо разрушения естественных местообитаний и образования изолирующих препятствий, происходило насыщение среды вредными химическими элементами (Снегин, 2009). Проведенный тест на степень разрушения ДНК в изучаемых популяциях отчасти подтвердил наши предположения, основанные на популяционно-генетических данных, о том, что в условиях антропогенной нагрузки могут усиливаться компенсаторные реакции геномов, обеспечивающие цитогенетическую стабильность.

Значения показателей разрушения ДНК приведены в табл. 2.

Согласно полученным данным, несмотря на сильную урбанизацию района исследования, уровень разрушения ДНК в исследуемых группах моллюсков можно считать незначительным, т.к. полученные средние показатели ИДК не достигают даже первой стадии разрушения. Это с одной стороны может говорить об отсутствии в пунктах сбора сильных повреждающих факторов, нарушающих цитогенетическую стабильность, а с другой стороны, позволяют предположить наличие репарационных, гомеостатических процессов, протекающих в организме животных, нейтрализующих отрицательные воздействия средовых компонентов. Тем не менее, определенные тенденции в направлении увеличения количества разрушенной ДНК по нашим данным прослеживаются.

Так однофакторный дисперсионный анализ, проведенный по совокупности всех исследуемых особей, выявил достоверные ($p \geq 0.05$) отличия изученных групп по индексу ДНК-комет (табл. 3). Аналогичный анализ, проведенный отдельно по двум наиболее массовым видам *Br. fruticum* и *Ch. tridens*, показал достоверную разницу только между популяциями кустарниковой улитки.

В ходе проведенного эксперимента нами отмечено увеличение степени повреждения ДНК в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов (пункты 8, 9, 10), вблизи автомобильных дорог (пункты 7, 13, 14), в условиях города (пункты 5, 11) а также в естественных сообществах, расположенных недалеко от сельскохозяйственных угодий (пункты 3, 6). Так, в заповедном участке Стенки Изгорья (пункт 6), несмотря на охранный статус и отсутствие вблизи промышленных производств, отмечено самое высокое для района исследования значение ИДК (0.352 ± 0.118) и большой процент ДНК в хвосте ($\% DNA_t = 11.15 \pm 0.74$; $tM = 13.20 \pm 0.75$). Такой эффект может быть как следствием мозаичного промышленного загрязнения, так и следствием загрязнения от сельхоз-

Таблица 2. Показатели разрушения ДНК в исследуемых группах моллюсков ($M \pm \Delta$)

Вид	Пункт	Проанализировано клеток	Количество ДНК-комет (%)	Количество апоптотических клеток (%)	ИДК	% ДНК в хвосте (% DNA _t)	Момент хвоста (tM)
<i>Br. fruticum</i>	1	2344	1.32	0.00	0.010 ± 0.009	5.6 ± 0.9	1.65 ± 0.70
	2	1727	1.91	0.00	0.020 ± 0.014	5.94 ± 1.51	1.18 ± 0.74
	3	1594	28.36	4.39	0.268 ± 0.128	6.91 ± 0.39	5.86 ± 1.29
	4	1964	5.19	0.76	0.068 ± 0.052	5.33 ± 0.60	2.33 ± 0.48
	5	1528	7.46	0.00	0.098 ± 0.061	6.38 ± 0.62	3.13 ± 0.65
	6	2188	11.11	0.00	0.352 ± 0.118	11.15 ± 0.74	13.20 ± 0.75
	7	1514	12.68	0.00	0.164 ± 0.120	7.14 ± 0.68	6.04 ± 1.38
	8	1441	8.88	0.00	0.135 ± 0.105	8.72 ± 0.75	6.00 ± 2.93
<i>Ch. tridens</i>	9	1555	6.50	0.00	0.098 ± 0.025	10.33 ± 0.93	4.60 ± 1.06
	10	1449	7.45	0.00	0.151 ± 0.074	11.34 ± 1.11	7.00 ± 2.33
	11	1154	11.18	0.00	0.177 ± 0.107	7.75 ± 0.71	4.63 ± 1.20
	12	1061	10.37	0.00	0.128 ± 0.069	7.56 ± 0.94	5.60 ± 1.70
<i>C. vindobonensis</i>	13	1141	9.20	5.00	0.207 ± 0.072	9.39 ± 1.09	6.58 ± 2.74
	14	1634	4.53	9.06	0.084 ± 0.068	8.62 ± 1.26	6.65 ± 2.50
<i>St. ravigieri</i>	15	1227	1.47	1.47	0.016 ± 0.014	5.33 ± 1.47	0.99 ± 0.42

Таблица 3. Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), проведенного на основе значений индекса ДНК-комет (ИДК)

Вид	Источник изменчивости	Число степеней свободы df	Сумма квадратов SS	Средний квадрат MS	F	P	F_{st}
<i>Br. fruticum</i>	Между группами	7	1.017	0.145	3.3938	0.003	2.140
	Внутри групп	72	3.084	0.043			
	Итого	79	4.102				
<i>Ch. tridens</i>	Между группами	3	0.046	0.015	0.979	0.413	2.866
	Внутри групп	36	0.562	0.016			
	Итого	39	0.608				
По всем видам	Между группами	14	1.280	0.091	2.766	0.001	1.766
	Внутри групп	135	4.462	0.033			
	Итого	149	5.742				

угодий. К этому участку примыкают пшеничные поля, занимающие водораздельные участки, откуда в результате летних ливневых дождей в окрестные понижения рельефа может происходить смыв удобрений и пестицидов. Примечательно, что у другого вида *Ch. tridens*, обитающего также на территории заповедника (пункт 12), но на меловых склонах, увеличения ИДК не наблюдалось.

Аналогичную картину увеличения доли разрушенной ДНК мы наблюдаем также в долине реки Пена (пункт 3), возможно, вследствие той же причины.

Наиболее “чистыми” по нашим данным оказались участки поймы рек Корень и Короча (пункты 1, 2).

Был проведен анализ колонии адвентивного вида *St. ravigieri* (пункт 15), который в последние годы активно осваивает территорию юга Среднерусской возвышенности, вытесняя местные виды улиток, включая *Br. fruticum* (Снегин и др., 2012). В этой связи, хотелось бы отметить, что, несмотря на обитание в явно загрязненном биотопе (особи были собраны возле обочины оживленной автомагистрали в центре города), показатели разрушения ДНК здесь одни из самых незначительных среди

Таблица 4. Показатели разрушения ДНК у особей *Br. fruticum* в группе “Сырцево” (пункт 3)

Условный возраст животного	№ животного	Проанализировано клеток	Индекс ДНК-комет	% ДНК в хвосте
Молодые (раковина менее 3-х оборотов)	1	211	0	0
	2	190	0	0
	3	125	0	0
	4	130	0	0
Взрослые (раковина более 5-ти оборотов)	5	128	1.086	8.46
	6	188	0.008	8.23
	7	108	0.336	6.82
	8	198	0.61	5.7
	9	166	0.505	6.906
	10	150	0.137	6.55

проанализированных групп (ИДК = 0.016 ± 0.014). В качестве возможных причин можно отметить как действие естественного отбора в адвентивной колонии, элиминирующего особей с малоактивным репарационным аппаратом, так и тот факт, что эволюционное становление этого вида происходило в горных условиях (исконный ареал охватывает Северокавказский регион), где, как известно, повышенная солнечная инсоляция способствует формированию популяций и видов с активными антимуtagenными свойствами (Алекперов, 1984). Полученные результаты свидетельствуют о необходимости тщательного изучения особенностей биологии видов, выбираемых для анализа.

Кроме того, нами зафиксированы достоверные отличия долей поврежденной ДНК у молодых и взрослых особей *Br. fruticum* в пункте 3 (табл. 4). Данный факт можно объяснить либо кумулятивным эффектом, либо естественными возрастными изменениями в структуре и функционировании клеток организма, приводящими к разрушению части ядерной ДНК (хотя последнее так же может быть связано с постепенным накоплением в теле моллюска токсичных компонентов). Полагаем, что это явление нужно учитывать при сопоставлении полученных результатов из разных пунктов, используя данные только по одновозрастным группам животных.

В заключение хотелось бы отметить, что выводы, сделанные нами в ходе данной работы, требуют определенной доли осторожности и диктуют необходимость дальнейшего изучения явления разрушения ДНК у наземных моллюсков, задействуя большее количество популяций и видов, а также использовать комплексное исследование средовых факторов, включая химический анализ почвы, растений и тканей животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алекперов У.К. Антимутагенез: Теоретические и практические аспекты. М.: Наука, 1984. 104 с.
- Крамаренко С.С., Хохуткин И.М., Гребенников М.Е. Особенности фенетической структуры наземного моллюска *Sepaea vindobonensis* (Pulmonata, Helicidae) в урбанизированных и природных популяциях // Экология. 2007. № 1. С. 42–48.
- Макеева В.М., Белоконь М.М., Малюченко О.П. Оценка состояния генофонда природных популяций беспозвоночных животных в условиях фрагментарного ландшафта Москвы и Подмосковья (на примере кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll) // Генетика. 2005. № 11. С. 1495–1510.
- Матёкин П.В. Фауна наземных моллюсков Нижнего Поволжья и ее значение для представления об истории современных лесов района // Зоологический журнал. 1950. Т. 29. Вып. 3. С. 193–205.
- Оганесян Г.Г., Симонян А.Э., Габриелян Б.К. и др. Оценка поврежденной ДНК в эритроцитах рыб из разных водоемов Армении методом ДНК-комет // Биолог. журн. Армении. 2012. № 4 (64). С. 64–70.
- Слободскова В.В., Солодова Е.Е., Челомин В.П. Деструкция ДНК клеток жабр двустворчатого моллюска *Corbicula japonica*, обитающего в приливно-отливной зоне // Проблемы экологии морского шельфа. Материалы 2-й Всероссийской научной молодежной конференции-школы. Владивосток: Изд-во Дальневост. федерального ун-та, 2011. С. 108–110.
- Снегин Э.А. Содержание химических элементов в раковинах наземных моллюсков в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов // Проблемы региональной экологии. 2009. № 1. С. 22–27.
- Снегин Э.А. Оценка состояния популяционных генофондов наземных моллюсков в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов на примере *Bradybaena fruticum* Müll (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. 2010. Т. VIII. № 2. С. 45–55.
- Снегин Э.А. Оценка жизнеспособности популяций особо охраняемого вида *Sepaea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга лесостепи Среднерусской возвышенности // Вестник КрасГАУ. 2011а. № 11. С. 142–148.

- Снегин Э.А. Генетическая структура популяций модельных видов наземных моллюсков в условиях урбанизированного ландшафта на примере *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. 2011б. Т. IX. № 2. С. 54–64.
- Снегин Э.А., Артемчук О.Ю., Сычев А.А. и др. К вопросу о генетической эрозии и генетической революции в популяциях урбанизированных территорий на примере наземных моллюсков // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка. Серія Біологія. 2012. № 2 (51). С. 245–249.
- Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. 2008. Т. 10. № 3. С. 303–309.
- Тронов В.А., Пелевина И.И. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применения метода // Цитология. 1996. Т. 38. № 4/5. С. 71–75.
- Chaubey R.C. Computerized image analysis software for the comet assay // Methods in Molecular Biology. 2005. V. 291. P. 97–106.
- Francesconi A., Del Terra E., Meli A., Ambesi-Impombato F.S. Standardization of the comet assay technique on FRTL5 cells // Physical Medicine. 2001. V. 17. Iss. 1. P. 232–234.
- Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R. et al. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the “Comet” assay // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. V. 41. P. 51–58.
- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1984. V. 123. № 1. P. 291–298.
- Olive P.L., Banath 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. С. 86–94.
- Olive P.L., Banath J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // Nature Protocols. 2006. № 1. P. 23–29.
- Struwe M., Greulich K.O., Suter W. et al. The photo comet assay—A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro // Mutation Research. 2007. V. 632. Iss. 1–2. P. 44–57.
- Shugart L.R. DNA damage as a biomarker of exposure // Ecotoxicology. 2000. V. 9. P. 329–340.
- Regoli F., Frenzili G., Bocchetti R. et al. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // Aquat. Toxicol. 2004. V. 68. P. 167–178.

Analysis of Cytogenetic Stability in Natural Populations of Terrestrial Mollusks (Based on DNA Comet Assay)

E. A. Snegin

Research Laboratory of Population Genetics and Genetic Toxicology, Belgorod National State Research University,
ul. Pobedy 85, Belgorod, 308014 Russia
e-mail: snegin@bsu.edu.ru

Received December 11, 2013; in final form, January 14, 2014

Abstract—Alkaline gel electrophoresis of isolated cells (comet assay) was used to assess degree of nuclear DNA damage in populations of terrestrial mollusks *Bradybaena fruticum* Müll., *Chondrula tridens* Müll., *Cepaea vindobonensis* Fer., and *Stenomphalia ravergieri* Fer. living in the forest-steppe landscape of the southern part of the Mid-Russian Upland. Evidence of differences in the parameters studied was found. The age dynamics of the degree of damage of the genetic apparatus was observed. Possible causes of the identified differences are discussed.

Keywords: terrestrial mollusks, DNA damage, DNA comet assay