

УДК 574.21

doi: 10.17223/19988591/55/4

Э.А. Снегин¹, А.С. Бархатов¹, В.В. Киселев²,
С.Р. Юсупов¹, Е.А. Снегина¹

¹ Научно-исследовательский центр геномной селекции
Белгородского государственного национального
исследовательского университета, г. Белгород, Россия

² Институт наук о Земле Белгородского государственного национального
исследовательского университета, г. Белгород, Россия

Оценка степени повреждения геномной ДНК популяций озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) Белгородской агломерации методом ДНК-комет

Методом гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) оценен уровень повреждения ДНК в популяциях озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*), обитающих в г. Белгороде и его окрестностях в пунктах с различным уровнем антропогенного пресса. Согласно полученным данным, во всех исследуемых популяциях среднее значение индекса ДНК-комет (DDI) не превысило первого порога деградации. Тем не менее рассчитанные значения DDI позволили выстроить градационную шкалу уровня разрушения ДНК в исследуемых группах лягушек, где значения DDI в наиболее загрязненных районах (от $0,416 \pm 0,031$ до $0,521 \pm 0,098$) превосходили относительно чистые территории ($0,057 \pm 0,011$). Отмечено, что в пунктах, в которых обитают особи с высокими значениями DDI, присутствует высокая концентрация нитритов, значительно превышающих предельно допустимые концентрации.

Ключевые слова: *Pelophylax ridibundus*; урбанизированная территория; генотоксичные поллютанты; метод ДНК-комет; биоиндикатор

Сокращения [Abbreviations]: DDI – индекс ДНК-комет [DDI - DNA damage index (comet assay)]; ПДК – предельно допустимая концентрация [Maximum permissible concentration].

Для цитирования: Снегин Э.А., Бархатов А.С., Киселев В.В., Юсупов С.Р., Снегина Е.А. Оценка степени повреждения геномной ДНК популяций озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) Белгородской агломерации методом ДНК-комет // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 58–76. doi: 10.17223/19988591/55/4

Введение

Антропогенное загрязнение водных объектов – серьезная проблема устойчивости водных экосистем [1]. Основные источники загрязнения водных объектов – сточные воды, смывы сельскохозяйственных удобрений,

пестицидов и автомобильных дорог [2]. Загрязнители, внесенные в водные экосистемы, приводят к геохимическим изменениям, что, в свою очередь, снижает качество физико-химических параметров водных объектов [3]. Многие из поллютантов, обладая высокой устойчивостью, представлены опасными мутагенами и канцерогенами. Вызванные ими нарушения в структуре и свойствах ДНК и РНК организмов могут иметь отдаленные последствия и сказываться на жизнедеятельности последующих поколений [4, 5].

Для объективной и качественной оценки воздействия генотоксичных поллютантов используются различные виды-биоиндикаторы. Наиболее информативными среди них являются гидробионты, так как водные объекты в первую очередь подвергаются воздействию широкого спектра загрязнителей окружающей среды [6, 7]. Бесхвостые земноводные, являясь связующим звеном в пищевых цепях, охватывающих водные и наземные сообщества, выступают в качестве важного компонента биоты водно-болотных угодий [8]. Тонкая и проницаемая кожа, а также жаберное дыхание на личиночной стадии позволяют этой группе животных активно накапливать поллютанты в организме [9].

В научной литературе описан ряд методов оценки степени повреждения ДНК: анализ хромосомных aberrаций [10], обмен сестринских хроматид [11], щелочная элюция [12], анализ микроядер [13] и др. Однако в последние годы наиболее востребованным для этих целей является метод ДНК-комет (Comet assay), который позволяет оценивать повреждения генетического материала в результате действия большого спектра мутагенов [14–16]. Преимуществами метода являются его доступность и способность обнаруживать начальные и неспецифические повреждения ДНК в различных тканях. При этом повреждения ядерных нуклеиновых кислот просматриваются на уровне отдельных клеток, что делает его пригодным для большинства типов эукариотических организмов. Кроме того, метод обладает высокой чувствительностью, что позволяет обнаруживать реакции организмов на самых ранних этапах воздействия генотоксикантов [17]. Гель-электрофорез изолированных клеток¹ применяют в различных областях исследований, главным образом, при оценке безопасности химических веществ и лекарственных средств, для выявления степени эффективности репарации ДНК, а также в биомониторинге природных популяций [18]. Данный метод позволяет обнаружить разрывы цепей ДНК, которые при проведении гель-электрофореза образуют так называемые хвосты, или «кометы». При этом размер наблюдаемого хвоста указывает на степень повреждения ДНК [19].

В проведенном нами ранее предварительном исследовании с помощью метода ДНК-комет выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение индекса ДНК-комет в одной популяции озерной лягушки, обитающей в условиях антропогенного загрязнения [20]. В дальнейшем эти исследования продолжены.

¹ Гель-электрофорез изолированных клеток является синонимом метода ДНК-комет. [The Comet Assay also called single cell gel electrophoresis].

Цель данной работы – оценить с помощью метода ДНК-комет уровень повреждения ДНК в популяциях *P. ridibundus*, обитающих в г. Белгороде и его окрестностях.

Материалы и методики исследования

Объект исследования – озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). Данный вид адаптирован к жизни в условиях антропогенного влияния и активно заселяет трансформированные биотопы [8]. Отбор животных проведен в 6 точках г. Белгорода и его окрестностей (рис. 1, табл. 1). При описании биотопов использована классификационная схема, предложенная В.Л. Вершининым [21].

Все работы с подопытными животными в исследовании проведены в соответствии с международными этическими стандартами [22]. Из каждой точки исследования отобрано по 5 половозрелых особей, что составляло небольшую часть популяции. Животных перед вскрытием наркотизировали диэтиловым эфиром. Ввиду высокой чувствительности метода для предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов анализ проводили в день сбора. В качестве материала для исследования использовали печень животного: данный орган обладает высокой чувствительностью к действию генотоксикантов и является основным местом биотрансформации ксенобиотиков [23].

Таблица 1 [Table 1]

Пункты сбора [Collection sites]

No	Название пункта [Collection site]	Описание биотопа [Description of the biotope]	Координаты [Coordinates]
1	Северский Донец [Seversky Donets]	р. Северский Донец, г. Белгород. Промышленная застройка [Seversky Donets river, Belgorod. Industrial buildings]	50°35'31.5"N 36°36'35.6"E
2	Оскочное [Oskochnoe]	Пруд Оскочное, г. Белгород. Малоэтажная застройка [Oskochnoye pond, Belgorod. Low-rise development]	50°38'52.1"N 36°33'29.6"E
3	Ячевский [Yachnevskiy]	Пруд Ячевский, г. Белгород. Малоэтажная застройка [Yachnevskiy pond, Belgorod. Low-rise development]	50°38'23.1"N 36°34'48.2"E
4	Севрюково [Sevrukovo]	р. Разумная, Белгородский район. Окрестность с. Севрюково. Зеленая зона [Razumnaya river, Belgorod municipal district. The vicinity of Sevrukovo village. Green area]	50°36'55.3"N 36°46'21.9"E
5	Разумное [Razumnoe]	Устье р. Разумная, г. Белгород. Малоэтажная застройка [Razumnaya river mouth, Belgorod. Low-rise development]	50°31'51.8"N 36°38'57.5"E
6	Везелка [Vezelka]	р. Везелка, г. Белгород. Многоэтажная застройка [Vezelka river, Belgorod. High-rise development]	50°35'36.8"N 36°34'09.1"E

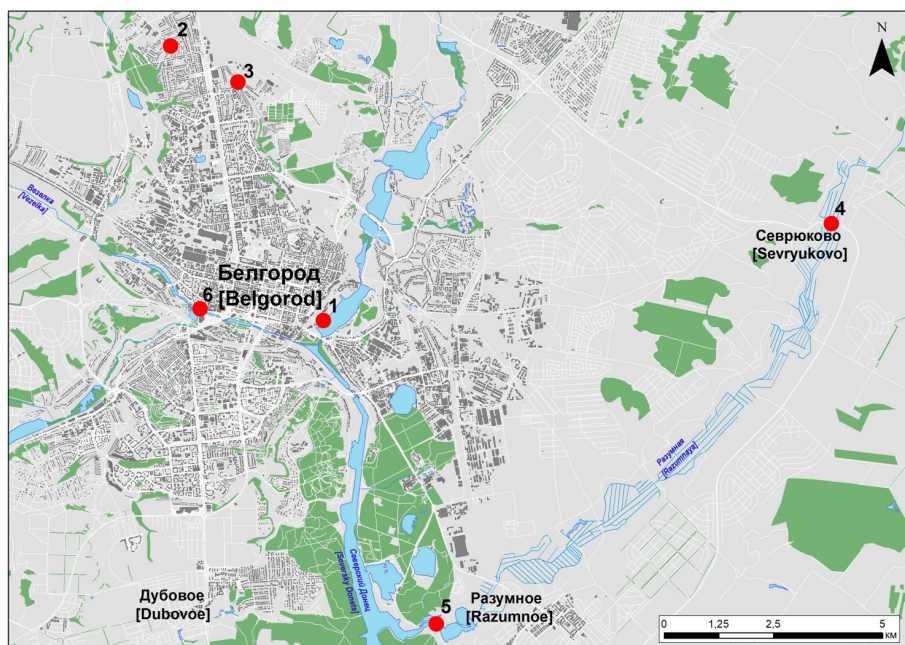


Рис. 1. Пункты сбора *Pelophylax ridibundus*: 1 – Северский Донец; 2 – Оскочное; 3 – Ячевевский; 4 – Севрюково; 5 – Разумное; 6 – Везелка

[Fig. 1. Collection sites *Pelophylax ridibundus*: 1 - Seversky Donets; 2 - Oskochnoe; 3 - Yachnevskiy; 4 - Sevrjukovo; 5 - Razumnoe; 6 - Vezelka]

По завершении эвтаназии животного незамедлительно проводили вскрытие и выделение анализируемого органа. Ткань (150–200 мг) гомогенизировали на льду, затем переносили в пробирки с 2 мл свежеприготовленного охлажденного до +4 °C фосфатно-солевого буфера (pH 7,5), содержащего 20 mM динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA-Na₂) и 10% диметилсульфоксид (ДМСО), дважды отмывали от клеток крови и растирали стеклянной палочкой в свежем буфере. Для осаждения крупных фрагментов ткани пробирки выдерживали 5 мин при комнатной температуре, после чего переносили 1,5 мл верхнего слоя в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали в микроцентрифуге 5415 R («Eppendorf», Германия) при 1000 g в течение 10 мин при +4 °C. Супернатант удаляли, осадок клеток разводили в 1 мл охлажденного до +4 °C фосфатного солевого буфера. Для получения микропрепаратов 60 мкл клеточной суспензии смешивали с 240 мкл 1% раствора легкоплавкой агарозы (T_{пл} < 42 °C) в фосфатно-солевом буфере. Затем в центральную часть предметного стекла с тонким слоем агарозы наносили 60 мкл агарозного геля с клеточной суспензией и накрывали покровным стеклом, не допуская образования пузырей. Предметные стекла охлаждали 10 мин, после чего аккуратно снимали покровные стекла. Последующие операции проводили в затемненном помещении. Стекла зали-

вали охлажденным до +4 °С лизирующим раствором, содержащим 10 мМ трис-НСl (рН 10), 2,5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА-Na₂ и 1% Тритон X-100 с 10% ДМСО, который добавляли непосредственно перед использованием. Лизис проводили не менее 1 ч. По окончании лизиса проводили электрофорез в трис-ЭДТА-боратном электродном буфере (ТВЕ) в течение 20 мин с напряжением из расчета 1 В/см. По окончании электрофореза препараты фиксировали 70% этанолом в течение 15 мин [23, 24].

Для окрашивания препаратов использовали водный раствор красителя SYBR Green I в соотношении 1:10 000. Окрашенные препараты анализировали на люминесцентном тринокулярном микроскопе МИКМЕД-2 АО («Ломо», Россия).

Полученные изображения анализировали в программном обеспечении CometScore V. 2.0. На каждом препарате анализировали не менее 100 клеточных ядер, которые подразделяли на 5 типов в зависимости от степени разрушения ДНК: 0 – без повреждения (<5%); 1 – незначительное повреждение (5–20%), 2 – умеренное повреждение (20–40%); 3 – высокое повреждение (40–80%); 4 – максимальное повреждение (>80%). Отдельно учитывали клетки, находящиеся в состоянии апоптоза. Степень поврежденности ДНК оценивали с использованием критерия Краскела–Уоллиса, который в данной методике называется «индекс ДНК-комет» (DDI), по формуле [24, 25]

$$DDI = \frac{(0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)}{\Sigma},$$

где $n_0 - n_4$ – число «ДНК-комет» каждого типа [The number of “DNA comets” of each type]; Σ – сумма подсчитанных клеток [Total of cells counted].

Для расчета значений DDI, средних показателей DDI и их погрешностей, статистической обработки данных использовали MS Excel 2010. Данные DDI представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок ($M \pm m_M$). Для определения статистической значимости различий изучаемых популяций использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Для оценки состояния естественных сообществ в различных ландшафтах необходимо осуществлять мониторинг населяющих их популяций. Особенно это касается видов биоиндикаторов антропогенного воздействия, которыми себя хорошо зарекомендовали бесхвостые земноводные.

Полученные в результате исследования данные представлены в табл. 2–4. В изучаемых популяциях отмечены ядра с различным уровнем повреждения ДНК (рис. 2, 3). Наибольшее значение DDI отмечено в пункте «Разумное», а наименьшее – в пункте «Севрюково». Стоит отметить, что в пункте «Разумное» наши предыдущие исследования выявили уровень $DDI = 0,141 \pm 0,021$

[20]. Столь низкие значения, вероятно, связаны с методической ошибкой, так как в предыдущей работе в данном пункте проанализированы половозрелые животные (сеголетки). В настоящем исследовании эта ошибка устранена и для анализа использованы только половозрелые особи. Эти данные подтверждают выводы, согласно которым с возрастом в теле животных наблюдается увеличение концентрации токсичных веществ, что сопровождается изменениями в структуре функционирования клеток и разрушением ядерной ДНК [26].

Таблица 2 [Table 2]

Средние значения DDI в исследуемых пунктах
[Mean values of DNA damage index (comet assay) at the studied sites] ($M \pm m_M$)

Пункт [Site]	Северский Донец [Seversky Donets]	Оскочное [Oscho- chnoe]	Ячев- ский [Yach- nevskiy]	Севрю- ково [Sevr- kovo]	Ра-зумное [Razum- noe]	Везелка [Vezel- ka]
DDI	0,454 $\pm 0,049$	0,472 $\pm 0,061$	0,186 $\pm 0,038$	0,057 $\pm 0,011$	0,521 $\pm 0,098$	0,416 $\pm 0,031$
N	512	520	506	585	521	523
Na	7	4	—	—	9	6

Примечание. DDI – индекс ДНК комет, N – количество проанализированных клеток; Na – количество клеток в состоянии апоптоза.

[Note. DDI - DNA damage index (comet assay); N - Number of cells analysed; Na - Number of cells in the state of apoptosis].

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил статистически значимые отличия ($p < 0,05$) изученных групп по индексу ДНК-комет (см. табл. 3).

Таблица 3 [Table 3]

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) значений DDI
[Results of one-way analysis of variance (ANOVA) of DNA damage index values]

Источник вариации [Source of variation]	SS	df	MS	F	p	F-критическое [F-critical]
Между группами [Between groups]	0,865	5	0,173	9,876	< 0,001	2,621
Внутри групп [Within groups]	0,421	24	0,017			

Примечание. SS – сумма квадратов отклонений; df – степень свободы; MS – дисперсия; F – критерий Фишера; p – уровень значимости; F-критическое – стандартное значение критерия Фишера при $p = 0,05$.

[Note. SS - Sum of squares; df - Degrees of freedom; MS - Mean square; F - Fisher criterion; p - significance level; F-critical - Standard value of Fisher's criterion at $p = 0.05$].

В табл. 4 представлены попарные сравнения средних значений DDI исследуемых популяций с помощью критерия Фишера.

Таблица 4 [Table 4]

Попарные сравнения средних значений DDI исследуемых популяций
[Pairwise comparisons of the mean DNA comet assay values of the populations studied]

Название пункта [Site]	Северский Донец [Seversky Donets]	Оскочное [Oskochnoe]	Ячневский [Yachnevskiy]	Севрюково [Sevrukovo]	Разумное [Razumnoe]	Везелка [Vezelka]
Северский Донец [Seversky Donets]						
Оскочное [Oskochnoe]	0,125					
Ячневский [Yachnevskiy]	14,609*	15,884*				
Севрюково [Sevrukovo]	47,332*	45,642*	10,555*			
Разумное [Razumnoe]	0,503	0,198	9,964*	21,688*		
Везелка [Vezelka]	0,147	0,611	21,115*	120,076*	1,011	

Примечание.* – статистически значимые различия ($p < 0,05$).

[Note. *The differences are significant ($p < 0.05$)].

Согласно полученным данным, во всех исследуемых популяциях средние значения DDI не превышают первого уровня разрушения. Это может свидетельствовать, с одной стороны, об отсутствии здесь больших концентраций генотоксичных поллютантов (что весьма сомнительно), а с другой – об эффективной работе репаративной системы озерных лягушек. Тем не менее рассчитанные значения DDI позволили выстроить градиционную шкалу уровня разрушения ДНК в исследуемых группах лягушек в зависимости от степени загрязнения и близости жилых и промышленных построек. Примечательно, что все исследуемые пункты по среднему значению DDI статистически значимо ($p < 0,05$) превзошли наименее загрязненный участок «Севрюково», который находится в зеленой зоне и на значительном удалении от урбанизированных территорий.

Известно, что генотоксичным воздействием обладают различные химические соединения, которые образуются при промышленном производстве [27]. К ним относят ряд полициклических ароматических углеводородов, тяжелые металлы, а также оксиды серы, углерода и азота [28–30]. Ввиду отсутствия у авторов возможности проведения химического анализа воды для выявления концентрации генотоксичных загрязнителей (в частности, соединений азота), мы проанализировали данные по загрязнению поверхностных вод в некоторых исследуемых пунктах из открытых литературных источников [31–35]. В результате анализа литературных данных гидрохимического мониторинга нами установлена степень азотного загрязнения рек Северский Донец, Везелка и Разумная в пределах Белгородского района.

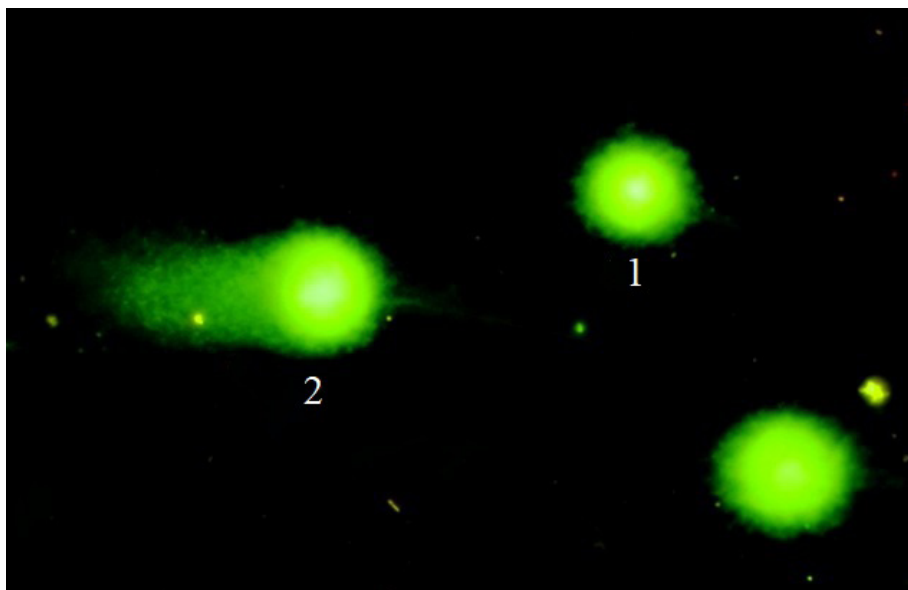


Рис. 2. Клетки с различной степенью повреждения ДНК:

1 – неразрушенное ядро; 2 – вторая стадия разрушения. Автор фото Э.А. Снегин

[Fig. 2. Cells with varying degrees of DNA damage:

1 - Cells with no DNA fragmentation - Undestroyed nucleus.

2 - The second stage of destruction of the nucleus. Photo by Eduard A Snegin]

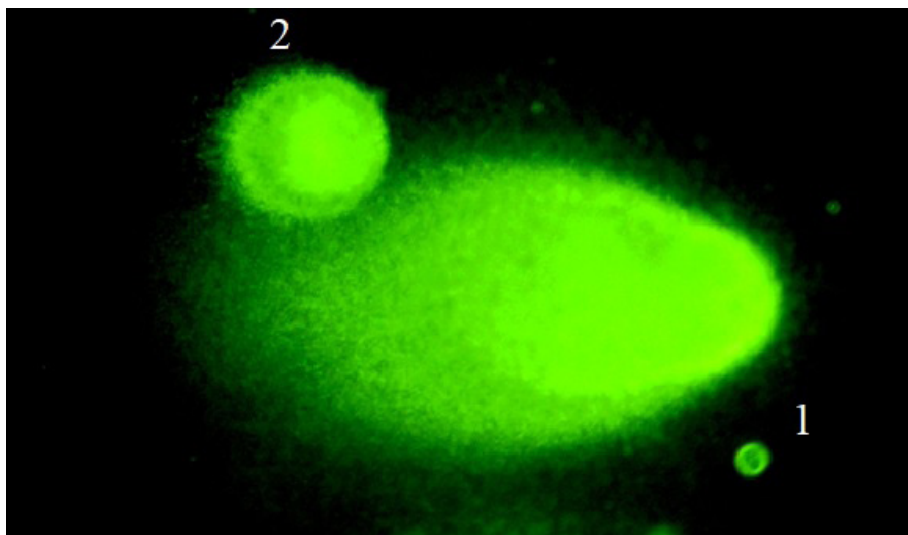


Рис. 3. Ядро клетки в состоянии апоптоза: 1 – ядро клетки

в состоянии апоптоза; 2 – неразрушенное ядро. Автор фото А.С. Бархатов

[Fig. 3. Cell nucleus in a state of apoptosis.

1 - Cell nucleus in the state of apoptosis; 2. Cells with no DNA fragmentation - Undestroyed nucleus. Photo by Anatoliy S Barkhatov]

Так, например, в промышленном районе города (пункт «Северский Донец») обнаружено высокое значение DDI – 0,454, при этом содержание нитратов (NO_3^-) составляет в среднем 1,61 мг/л, что не превышает предельно допустимую концентрацию (ПДК – 40 мг/л). Однако содержание нитритов (NO_2^-) колебалось от 0,654 до 0,695 мг/л, что превысило ПДК (0,08 мг/л) в 8 раз. Следует отметить, что в данной реке в северной части Белгородского района за последние 8–10 лет наблюдается рост содержания нитратов (NO_3^-) и суммы общего азота на 50–60%, что связано с активным развитием животноводческой отрасли в верховьях реки.

В пункте «Везелка», где значение DDI одно из самых высоких (0,416), в одноименной реке наблюдалось варьирование концентрации нитритов (NO_2^-) от 0,483 до 1,583 мг/л, что практически в 20 раз превышает значение ПДК. При этом содержание нитратов (NO_3^-) ПДК не превысило (значения варьировали от 1,144 до 6,349 мг/л).

Наибольшее значение DDI зафиксировано в устье р. Разумная (пункт «Разумное») (DDI = 0,521). По данным литературы, в этой точке, также и в реках Северский Донец и Везелка, наблюдаются систематические превышения ПДК по содержанию нитритов в три раза (NO_2^- , от 0,124 до 0,259 мг/л). В достаточно большом количестве наблюдаются здесь и концентрация нитратов (NO_3^- , от 5,021 до 5,743 мг/л), однако превышения ПДК по ним не выявлено.

Подобные значения загрязняющих веществ в р. Разумная напрямую связаны с тем, что преобладающая часть водосборной территории этой реки занята «неканализованной» частной застройкой, а также пашней, куда ежегодно вносятся азотные удобрения, поэтому показатели загрязнения здесь возрастают по мере продвижения от истока реки к устью, где она впадает в р. Северский Донец. В верховье реки (пункт «Севрюково»), где отсутствуют явные загрязнители, наблюдается быстрое течение, что способствует процессу самоочищения реки. В дальнейшем, когда течение реки становится спокойным, она переходит в зону интенсивной городской застройки с высокой долей промышленных предприятий, где городские территории вносят свой вклад в азотное загрязнение водной среды вплоть до устья. Данный факт отчасти объясняет наибольшее количество поврежденных ядер у исследованных особей в пункте «Разумное», несмотря на его удаленность от промышленного района города. Кроме того, в образцах из данного пункта отмечено наибольшее количество клеток в состоянии апоптоза. По ранее опубликованным данным [36], особи, обитающие в указанном локалитете, имеют низкие показатели индекса печени. Это соответствует концепции, получившей развитие в работах С.С. Шварца, согласно которой в условиях загрязненных водоемов наблюдается повышение энергетических затрат («энергетическая плата») для адаптивной реакции организмов в изменяющихся условиях среды обитания [37–39].

Стоит отметить, что полученные нами данные сопоставимы с результатами других исследований комплекса среднеевропейских зеленых лягушек (*P. esculentus* complex), которые зарекомендовали себя как отличные биоиндикаторы ввиду их высокой чувствительности к факторам окружающей среды [40]. Так, исследования в Центральной Анатолии (Турция) показали, что у *P. ridibundus* наблюдается достоверное увеличение уровня повреждения ДНК в изучаемых группах по сравнению с контролем [41]. Аналогичное исследование на примере *P. esculentus* L., 1758 проведено в г. Неаполе (Италия), в котором отбор проб проводили вблизи незаконных свалок и участков с интенсивным земледелием, в качестве контроля использовали животных, содержащихся в лаборатории при оптимальных условиях. В своей работе авторы отмечают, что природные популяции подвержены воздействию генотоксичных загрязнителей, связанному с проблемой отходов, с одной стороны, и интенсивным сельским хозяйством – с другой [42].

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании выявлено повышение степени разрушения ДНК в популяциях озерных лягушек на антропогенно-измененных территориях г. Белгорода и его окрестностей. При этом повышение уровня токсичных веществ может способствовать снижению жизнеспособности особей как анализируемого вида, так и других видов гидробионтов, что негативно скажется в целом на биоразнообразии региона.

Литература

1. McGlashan D.J., Hughies J.M. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range // Journal of Fish Biology. 2001. Vol. 59. PP. 55–67. doi: [10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x)
2. Hariri M., Mirvaghefi A., Farahmand H., Taghavi L., Shahabinia A.R. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on feral brown trout (*Salmo trutta fario*) // Environ Toxicol Pharmacol. 2018. Vol. 58. PP. 59–69. doi: [10.1016/j.etap.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.024)
3. Reid A.J., Carlson A.K., Creed I.F., Eliason E.J., Gell P.A., Johnson P.T.J., Kidd K.A., MacCormack T.J., Olden J.D., Ormerod S.J., Smol J.P., Taylor W.W., Tockner K., Vermaire J.C., Dudgeon D., Cooke S.J. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity // Biological Reviews. 2018. Vol. 94. PP. 849–873. doi: [10.1111/brv.12480](https://doi.org/10.1111/brv.12480)
4. Bolognesi C., Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals // Mutagenesis. 2010. Vol. 26. PP. 205–213. doi: [10.1093/mutage/geq073](https://doi.org/10.1093/mutage/geq073)
5. Bickham J.W., Sandhu S., Hebert P.D.N., Chikhi L., Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology // Mutation Research. 2000. Vol. 463, № 1. PP. 33–51. doi: [10.1016/S1383-5742\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00004-1)
6. Russo C., Rocco L., Morescalchi M.A., Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two

- natural environments // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004. Vol. 57. PP. 168–174. doi: [10.1016/S0147-6513\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00027-7)
7. Ameur W.B., El Megdiche Y., de Lapuente J., Barhoumi B., Trabelsi S., Ennaceur S., Camps L., Serret J., Ramos-López D., Gonzalez-Linares J., Touil S., Driss M.R., Borrás M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia // *Chemosphere*. 2015. Vol. 135. PP. 67–74. doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.02.050](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050)
 8. Zhelev Z.M., Arnaudova D.N., Popgeorgiev G.S., Tsonev S.V. In situ assessment of health status and heavy metal bioaccumulation of adult *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) individuals inhabiting polluted area in southern Bulgaria // *Ecological Indicators*. 2020. Vol. 115. PP. 1–15. doi: [10.1016/j.ecolind.2020.106413](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106413)
 9. Burlibasa L., Gavrilă L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity // *Applied Ecology and Environmental Research*. 2011. Vol. 9. PP. 1–15. doi: [10.15666/AEER/0901_001015](https://doi.org/10.15666/AEER/0901_001015)
 10. Natarajan A.T. Chromosome aberrations: past, present and future // *Mutat. Res.* 2002. Vol. 504, Iss. 1–2. PP. 3–16. doi: [10.1016/s0027-5107\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00075-1)
 11. Wilson M., Thompson L.H. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange // *Mutat. Res.* 2007. Vol. 616, Iss. 1–2. PP. 11–23. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017)
 12. Swenberg A. Utilization of the alkaline elution assay as a short-term test for chemical carcinogens // *Short-term Tests for chemical carcinogens. Topics in environmental physiology and medicine*. Springer. 1981. PP. 48–58. doi: [10.1007/978-1-4612-5847-6_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5847-6_5)
 13. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells // *Mutagenesis*. 2011. Vol. 26. PP. 125–132. doi: [10.1093/mutage/geq052](https://doi.org/10.1093/mutage/geq052)
 14. Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models // *Cell Biology and Toxicology*. 2009. Vol. 25. PP. 5–32. doi: [10.1007/s10565-008-9072-z](https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z)
 15. Gajski G., Zegura B., Ladeira C., Pourrut B., Del Bo' C., Novak M., Sramkova M., Milic M., Gutzkow K.B., Costa S., Dusinska M., Brunborg G., Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates) // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2019. Vol. 779. PP. 82–113. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.02.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.003)
 16. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // *Biochemical and Biophysical*. 1984. Vol. 123, № 1. PP. 291–298. doi: [10.1016/0006-291x\(84\)90411-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)90411-x)
 17. Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments // *Mutation Research*. 2009. Vol. 681. PP. 80–92. doi: [10.1016/j.mrrev.2008.03.001](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001)
 18. 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.
 19. 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 // *Radiation Research*. 1990. Vol. 122, № 1. PP. 86–94.
 20. Snegin E.A., Barkhatov A.S., Snegina E.A., Adamova V.V. Estimation of damage in populations of marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) based on DNA comet assay // *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 5, № 6. PP. 6091–6094. doi: [10.5281/zenodo.1304332](https://doi.org/10.5281/zenodo.1304332)
 21. Экология города : учеб. пособие / В.Л. Вершинин. Екатеринбург : Изд-во Уральского университета, 2014. 88 с.

22. Липатов В.А., Северинов Д.А., Крюков А.А., Саакян А.Р. Этические и правовые аспекты проведения экспериментальных биомедицинских исследований *in vivo*. Часть II // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2019. Т. 27, № 2. С. 245–257. doi: [10.23888/PAVLOVJ2019272245-257](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019272245-257)
23. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Сиднева Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А., Середенин С.Б., Бекиш В.Я., Чернуха И.М. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений : методические рекомендации. М. : Полиграфсервис, 2006. 28 с.
24. Филиппов Э.В. Использование метода «ДНК-комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды // Природные ресурсы Арктики и Субарктики (Наука и образование). 2014. № 2 (74). С. 72–78.
25. Struwe M., Greulich K.O., Suter W., Plappert-Helbig U. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro // Mutation Research. 2007. Vol. 632. PP. 44–57. doi: [10.1016/j.mrgentox.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.014)
26. Snegin E.A. Analysis of cytogenetic stability in natural populations of terrestrial mollusks (based on DNA comet assay) // Russian Journal of Developmental Biology. 2014. Vol. 45, № 3. PP. 143–148. doi: [10.1134/S1062360414030060](https://doi.org/10.1134/S1062360414030060)
27. Engström W., Darbre P., Eriksson S., Gulliver L., Hultman T., Karamouzis M.V., Klaunig J.E., Mehta R., Moorwood K., Sanderson T., Sone H., Vadgama P., Wagemaker G., Ward A., Singh N., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Amedei A., Colacci A.M., Vaccari M., Mondello C., Scovassi A.I., Raju J., Hamid R.A., Memeo L., Forte S., Roy R., Woodruff J., Salem H.K., Ryan E.P., Brown D.G., Bisson W.H. The potential for chemical mixtures from the environment to enable the cancer hallmark of sustained proliferative signaling // Carcinogenesis. 2015. Vol. 36. PP. 838–860. doi: [10.1093/carcin/bgv030](https://doi.org/10.1093/carcin/bgv030)
28. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). М. : Медицина, 1998. 328 с.
29. Koedrith P., Kim H., Weon J.I., Seo Y.R. Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity // International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2013. Vol. 216. PP. 587–598. doi: [10.1016/j.ijheh.2013.02.010](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.02.010)
30. Tamir S., Burney S., Tannenbaum S.R. DNA damage by nitric oxide // Chemical Research in Toxicology. 1996. Vol. 9. PP. 821–827. doi: [10.1021/tx9600311](https://doi.org/10.1021/tx9600311)
31. Киселев В.В., Корнилов А.Г. Геоэкологические аспекты развития современного интенсивного свиноводства на территории Белгородской области // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2019. Т. 43, № 1. С. 98–108. doi: [10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108)
32. Стороженко Е.А., Корнилов А.Г., Марынич С.Н. Пространственная динамика азотного загрязнения рек города Белгорода // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2018. Т. 42, № 3. С. 427–434. doi: [10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434)
33. Киселев В.В., Курепина В.А., Корнилов А.Г. Динамика гидроэкологических показателей малых рек Белгородской области // Проблемы природопользования и экологическая ситуация в Европейской России и на сопредельных территориях. 2019. С. 348–350.
34. Стороженко Е.А., Марынич С.Н., Корнилов А.Г. Азотное загрязнение реки Болховец в период половодья (паводка) в 2019 году // Проблемы природопользования и экологическая ситуация в Европейской России и на сопредельных территориях. 2019. С. 378–382.

35. Марыныч С.Н., Стороженко Е.А., Корнилов А.Г. Гидрохимическая ситуация на водных объектах разного типа бассейна реки Северский Донец (в части азотного загрязнения) // Эколого-географические исследования в речных бассейнах. 2018. С. 212–216.
36. Снегин Э.А., Бархатов А.С. Морфогенетическая структура популяций озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura) в условиях городской среды // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 1. С. 47–53. doi: [10.25750/1995-4301-2019-1-047-053](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-1-047-053)
37. Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск : Изд-во АН СССР, 1968. 387 с.
38. Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М. : Наука, 1980. 277 с.
39. Спирина Е.В. Морфофизиологические адаптации *Rana ridibunda* Pall. под влиянием загрязнения // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2009. № 12(62). С. 64–68.
40. Gajski G., Žegura B., Ladeira C., Novak M., Sramkova M., Pourrut B., Del Bo' C., Milić M., Gutzkow K.B., Costa S., Dusinska M., Brunborg G., Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2019. Vol. 781. PP. 130–164. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.04.002)
41. Erismis U.C., Cigerci I.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 // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2013. Vol. 90. PP. 660–665. doi: [10.1007/s00128-013-0991-x](https://doi.org/10.1007/s00128-013-0991-x)
42. Maselli V., Polese G., Rippa D., Ligrone R., Rastogi R.K., Fulgione D. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring Provinces // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010. Vol. 73. PP. 1525–1529. doi: [10.1016/j.ecoenv.2010.05.011](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.011)

Поступила в редакцию 10.03.2021 г.; повторно 21.06.2021 г.;
принята 27.08.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.

Авторский коллектив:

Снегин Эдуард Анатольевич, д-р биол. наук, профессор, директор Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7574-6910>

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Бархатов Анатолий Сергеевич, аспирант, м.н.с. Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9996-7251>

E-mail: barkhatov@bsu.edu.ru

Киселев Владислав Викторович, аспирант, учебный мастер кафедры географии, геоэкологии и безопасности жизнедеятельности Института наук о Земле «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

E-mail: kiselev_v@bsu.edu.ru

Юсупов Сергей Рискулович, аспирант, м.н.с. Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

E-mail: yusupov@bsu.edu.ru

Снегина Елена Андреевна, м.н.с. Научно-исследовательского центра Геномной селекции «НИУ БелГУ» (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1789-1121>

E-mail: snegina@bsu.edu.ru

For citation: Snegin EA, Barkhatov AS, Kiselev VV, Yusupov SR, Snegina EA. Estimation of genomic DNA damage in populations of the marsh frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) of the Belgorod agglomeration by DNA comet assay. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:58-76. doi: 10.17223/19988591/55/4 In Russian, English Summary

**Eduard A. Snegin¹, Anatoliy S. Barkhatov¹, Vladislav V. Kiselev²,
Sergei R. Yusupov¹, Elena A. Snegina¹**

¹Research Center for Genomic Selection, Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation

²Institute of Earth Sciences, Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation

**Estimation of genomic DNA damage in populations of the marsh frog
(*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) of the Belgorod agglomeration by DNA comet assay**

Anthropogenic pollution of water bodies is a serious problem for the sustainability of aquatic ecosystems. The main sources of pollution of water bodies are wastewater, washouts from agricultural fertilizers, pesticides and roads. Many of highly persistent pollutants are dangerous mutagens and carcinogens. The disruption they cause to the DNA and RNA structure and properties of organisms can have long-term consequences and can affect the livelihood of future generations. Among existing DNA damage estimation methods, DNA comet assay is the most widespread due to its accuracy and reliability. In our study, the marsh frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) was chosen as an object of study. This species is adapted to life under anthropogenic influence and actively inhabits transformed biotopes. The aim of our work was to estimate the level of DNA damage by DNA comet assay of *P. ridibundus* inhabiting Belgorod city and its suburbs.

We studied a total of 6 marsh frog populations, with collection sites differing in the degree of anthropogenic pressure (See Table 1 and Fig. 1), and we selected 5 individuals of *P. ridibundus* from each locality. The experimental animals were handled in accordance with international ethical standards. Animal liver was used as the material for the study and analysis was performed on the day of collection. Tissue was homogenized in phosphate-salt buffer (pH 7.5) containing 20 mM EDTA-Na₂ and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) at +4 °C. To precipitate large fragments, tubes were incubated for 5 min at room temperature before transferring 1.5 ml of the top layer to microcentrifuge tubes and centrifuged in a 5415 R Eppendorf microcentrifuge (Germany) at 1000 g for 10 min at +4 °C. The supernatant was removed and the cell precipitate was diluted in 1 ml of phosphate salt buffer cooled to +4 °C. To obtain microarrays, 60 µl of cell suspension was mixed with 240 µl of 1% fusible agarose solution (t<42 °C). The lysis was performed for at least one hour at +4 °C (lysis buffer: 10mM Tris-HCl (pH 10) 2.5M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂ and 1% Triton X-100 with 10% DMSO). Electrophoresis was performed in a darkened room in Tris-EDTA-borate electrode buffer (TBE) for 20 min at a voltage of 1V/cm. At the end of electrophoresis, the preparations were fixed with 70% ethanol for 15 min. The preparations were stained with SYBR Green I dye, with subsequent analysis using a luminescent trinocular microscope MIKMED-2 of Lomo (Russia), with at least 100 cells analyzed from each preparation, which were divided into 5 types; cells in the state of apoptosis were counted separately (Durnev, et al., 2006). The degree of DNA damage was estimated using the Kruskal-Wallis criterion ("DNA comet index") (Struwe et al., 2007; Filippov, 2014). To determine the statistical significance of differences between the studied populations we used

one-way analysis of variance (ANOVA); statistically significant differences were considered at $p < 0.05$.

According to the data obtained, in all studied populations, the mean value of the DNA damage index (DDI) did not exceed the first threshold of DNA degradation (See Table 2). This may indicate, on the one hand, the absence of high concentrations of genotoxic pollutants here (which is highly doubtful) and, on the other hand, the efficient operation of the reparative system of marsh frog. Nevertheless, the calculated DDI values made it possible to construct a gradational scale of DNA destruction level in the studied groups of frogs depending on the degree of pollution and proximity of residential and industrial buildings (See Table 2-4). Various chemical compounds from industrial production, particularly nitrogen compounds, are known to have genotoxic effects. Due to the lack of possibility to perform chemical analysis of water to identify concentrations of genotoxic pollutants, we analysed data on surface water pollution in some of the investigated locations from open literature sources. As a result of this analysis, we revealed the dynamics of surface water pollution. All investigated points by the mean value of the statistical DDI surpassed reliably the least polluted site "Sevrukovo", which is located in the green zone and at a considerable distance from urbanized areas (See Table 2-4). High values of DDI were fixed in a zone of industrial and multi-storey buildings, localities "Seversky Donets" (DDI = 0.454) and "Veselka" (DDI = 0.416). Exceeding maximum permissible concentration of nitrogen compounds is observed in the above mentioned rivers. Noteworthy is the fact that the highest value of the DDI (0.521) was recorded in the estuary of the Razumnaya River remote from the industrial part of the city ("Razumnoye"). It should be noted that in this locality there is the greatest number of damaged cells, including apoptosis (See Table 2, Fig. 2 and 3). The highest DDI value is due to the high level of pollutants, since the predominant part of the river is occupied by "non-sewered" private low-rise buildings, as well as arable land. At the same time in the upper part of the river ("Sevryukovo") due to the lack of obvious pollutants and the intensive current contributing to self-purification of the river, we recorded the minimum value of the DDI (0.057) and the absence of cells in the state of apoptosis.

Thus, the present study revealed an increase in the degree of DNA destruction in populations of marsh frogs in the impacted areas of the city of Belgorod and its surroundings. At the same time, increased levels of toxic substances may contribute to a decrease in the viability of individuals of both analyzed species and other hydrobiont species, which will negatively affect the biodiversity of the region as a whole.

The paper contains 3 Figures, 4 Tables and 42 References.

Key words: *Pelophylax ridibundus*; comet assay; urbanized area; genotoxic pollutants; bioindicator

Abbreviations: DDI - DNA damage index (comet assay); MPC - Maximum permissible concentration [ПДК In Russian].

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. McGlashan DJ, Hughies JM. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range. *Journal of Fish Biology*. 2001;59:55-67. doi: [10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb01378.x)
2. Hariri M, Mirvaghefi A, Farahmand H, Taghavi L, Shahabinia AR. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on

- feral brown trout (*Salmo trutta fario*). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;58:59-69. doi: [10.1016/j.etap.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.024)
3. Reid AJ, Carlson AK, Creed IF, Eliason EJ, Gell PA, Johnson PTJ, Kidd KA, MacCormack TJ, Olden JD, Ormerod SJ, Smol JP, Taylor WW, Tockner K, Vermaire JC, Dudgeon D, Cooke SJ. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*. 2018;94:849-873. doi: [10.1111/brv.12480](https://doi.org/10.1111/brv.12480)
 4. Bolognesi C, Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*. 2010;26:205-213. doi: [10.1093/mutage/geq073](https://doi.org/10.1093/mutage/geq073)
 5. Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L, Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*. 2000;463(1):33-51. doi: [10.1016/s1383-5742\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(00)00004-1)
 6. Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004;57:168-174. doi: [10.1016/S0147-6513\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00027-7)
 7. Ameer WB, El Megdiche Y, de Lapuente J, Barhoumi B, Trabelsi S, Ennaceur S, Camps L, Serret J, Ramos-López D, Gonzalez-Linares J, Touil S, Driss MR, Borrás M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*. 2015;135:67-74. doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.02.050](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050)
 8. Zhelev ZM, Arnaudova DN, Popgeorgiev GS, Tsonev SV. In situ assessment of health status and heavy metal bioaccumulation of adult *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) individuals inhabiting polluted area in southern Bulgaria. *Ecological Indicators*. 2020;115:1-15. doi: [10.1016/j.ecolind.2020.106413](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106413)
 9. Burlibasa L, Gavrila L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2011;9:1-15. doi: [10.15666/AEER/0901_001015](https://doi.org/10.15666/AEER/0901_001015)
 10. Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res*. 2002;504(1-2):3-16. doi: [10.1016/s0027-5107\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00075-1)
 11. Wilson M, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res*. 2007;616(1-2):11-23. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017)
 12. Swenberg A. Utilization of the alkaline elution assay as a short-term test for chemical carcinogens. Short-term Tests for chemical carcinogens. Topics in environmental physiology and medicine. Springer. 1981: 48-58. doi: [10.1007/978-1-4612-5847-6_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5847-6_5)
 13. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):125-132. doi: [10.1093/mutage/geq052](https://doi.org/10.1093/mutage/geq052)
 14. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*. 2009;25:5-32. doi: [10.1007/s10565-008-9072-z](https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z)
 15. Gajski G, Zegura B, Ladeira C, Pourrut B, Del Bo' C, Novak M, Sramkova M, Milic M, Gutzkow KB, Costa S, Dusinska M, Brunborg G, Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales - (Part 1 Invertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2019;779:82-113. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.02.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.003)
 16. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical*. 1984;123(1):291-298. doi: [10.1016/0006-291x\(84\)90411-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)90411-x)
 17. Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*. 2009;681:80-92. doi: [10.1016/j.mrrev.2008.03.001](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001)

18. Sorochinska JB, Mikhailenko VM. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents. *Onkologiya = Oncology*. 2008;10(3):303-308. In Russian, English Summary
19. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research*. 1990;122(1):86-94
20. Snegin EA, Barkhatov AS, Snegina EA, Adamova VV. Estimation of damage in populations of marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) based on DNA comet assay. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;5(6):6091-6094. doi: [10.5281/zenodo.1304332](https://doi.org/10.5281/zenodo.1304332)
21. Vershinin VL. *Ekologiya goroda: Uchebnoe posobie* [Urban ecology. Textbook]. Yekaterinburg: Urals University Publishers; 2014. 88 p. In Russian
22. Lipatov VA, Kryukov AA, Severinov DA, Saakyan AR. Ethical and legal aspects of in vivo experimental biomedical research of the conduct. Part II. *IP Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2019;27(2):245-257. doi: [10.23888/PAVLOVJ2019272245-257](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019272245-257)
23. Durnev AD, Zhanataev AK, Anisina EA, Sidneva ES, Nikitina VA, Oganesyants LA, Seredenin SB, Bekish VYa, Chernukha IM. Primenenie metoda shchelochного gel'-elektroforeza izolirovannykh kletok dlya otsenki genotoksicheskikh svoystv prirodnkh i sinteticheskikh soedineniy [Application of the alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess genotoxic properties of natural and synthetic compounds]. Guidelines. Moscow: Poligrafservis Publ.; 2006. 28 p. In Russian
24. Filippov EV. Ispol'zovanie metoda «DNK-komet» dlya detektsii i otsenki stepeni povrezhdeniy DNK kletok organizmov rasteniy, zhivotnykh i cheloveka, vyzvannykh faktorami okruzhayushchey sredy [Using DNA comet assay for detecting and estimating the degree of DNA damage to cells in plant, animal and human organisms caused by environmental factors]. *Prirodnye resursy Arktiki i Subarktiki (Nauka i obrazovanie) = Natural Resources of the Arctic and Subarctic (Science and Education)*. 2014;2(74):72-78. In Russian
25. Struwe M, Greulich KO, Suter W, Plappert-Helbig U. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutation Research*. 2007;632:44-57. doi: [10.1016/j.mrgentox.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.014)
26. Snegin E.A. Analysis of cytogenetic stability in natural populations of terrestrial mollusks (based on DNA comet assay). *Russian Journal of Developmental Biology*. 2014. 45(3):143-148. doi: [10.1134/S1062360414030060](https://doi.org/10.1134/S1062360414030060)
27. Engström W, Darbre P, Eriksson S, Gulliver L, Hultman T, Karamouzis MV, Klaunig JE, Mehta R, Moorwood K, Sanderson T, Sone H, Vadgama P, Wagemaker G, Ward A, Singh N, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Colacci AM, Vaccari M, Mondello C, Scovassi AI, Raju J, Hamid RA, Memeo L, Forte S, Roy R, Woodrick J, Salem HK, Ryan EP, Brown DG, Bisson WH. The potential for chemical mixtures from the environment to enable the cancer hallmark of sustained proliferative signaling. *Carcinogenesis*. 2015;36:838-860. doi: [10.1093/carcin/bgv030](https://doi.org/10.1093/carcin/bgv030)
28. Durnev AD, Seredenin SB. Mutageny (skrining i farmakologicheskaya profilaktika vozdeystviy) [Mutagens (screening and pharmacological prevention of exposure)]. Moscow: Meditsina Publ.; 1998. 328 p. In Russian
29. Koedrith P, Kim H, Weon JI, Seo YR. Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013;216:587-598. doi: [10.1016/j.ijheh.2013.02.010](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.02.010)
30. Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. *Chemical Research in Toxicology*. 1996;9:821-827. doi: [10.1021/tx9600311](https://doi.org/10.1021/tx9600311)
31. Kiselev VV, Kornilov AG. Geoecological aspects of development of modern intensive pig farming in the Belgorod region. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo*

- universiteta. Serija: Estestvennye nauki = Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences series. 2019;43(1):98-108. doi: [10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2019-43-1-98-108) In Russian, English Summary
32. Storozhenko EA, Kornilov AG, Marynych SN. Spatial dynamics of nitrogen pollution of small rivers of Belgorod. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Estestvennye nauki = Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences series.* 2018;42(3):427-434. doi: [10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434](https://doi.org/10.18413/2075-4671-2018-42-3-427-434) In Russian, English Summary
33. Kiselev VV, Kurepina VA, Kornilov AG. Dinamika gidroekologicheskikh pokazateley malykh rek Belgorodskoy oblasti [Dynamics of hydroecological parameters of small rivers of Belgorod region]. In: *Problemy prirodopol'zovaniya i ekologicheskaya situatsiya v Evropeyskoy Rossii i na sopredel'nykh territoriyakh.* Materialy nauch. konf. [Problems of nature management and ecological situation in European Russia and adjacent territories. Proceedings of the VIII Int. Sci. Conf. (Belgorod, Russia, 22-25 October, 2019)]. Belgorod: Publishing house "Belgorod"; 2019. pp. 348-350. In Russian
34. Storozhenko EA, Marynych SN, Kornilov AG. Azotnoe zagryaznenie reki Bolkhovets v period polovod'ya (pavodka) v 2019 godu [Nitrogen pollution of the Bolkhovets river during the river flood in 2019]. In: *Problemy prirodopol'zovaniya i ekologicheskaya situatsiya v Evropeyskoy Rossii i na sopredel'nykh territoriyakh.* Materialy nauch. konf. [Problems of nature management and ecological situation in European Russia and adjacent territories. Proceedings of the VIII Int. Sci. Conf. (Belgorod, Russia, 22-25 October, 2019)]. Belgorod: Publishing house "Belgorod"; 2019. pp. 378-382. In Russian
35. Marynych SN, Storozhenko EA, Kornilov AG. Gidrokhimicheskaya situatsiya na vodnykh ob'ektakh raznogo tipa basseyna reki Severskiy Donets (v chasti azotnogo zagryazneniya) [Hydrochemical situation in water bodies of different types in the Seversky Donets river basin (in terms of nitrogen pollution)]. In: *Ekologo-geograficheskie issledovaniya v rechnykh basseynakh.* Materialy nauch. konf. [Ecological and geographical studies in river basins. Proceedings of the Fifth All-Russian Sci. and Pract. Conf. (Voronezh, Russia, 5-7 October, 2018)]. Voronezh: NAUKAUNIPRESS; 2018. pp. 212-216. In Russian
36. Snegin EA, Barkhatov AS. Morphogenetic structure of marsh frog populations of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura) under conditions of urban environment. *Theoretical and Applied Ecology.* 2019;1:47-53. doi: [10.25750/1995-4301-2019-1-047-053](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-1-047-053) In Russian, English Summary
37. Shvarts SS, Smirnov VS, Dobrinskiy LN. Metod morfofiziologicheskikh indikatorov v ekologii nazemnykh pozvonochnykh [Method of morphophysiological parameters in the ecology of terrestrial vertebrates]. Sverdlovsk: AN SSSR Publ.; 1968. 387 p. In Russian
38. Shvarts SS. Ekologicheskie zakonomernosti evolyutsii [Ecological patterns of evolution]. Moscow: Nauka Publ.; 1980. 227 p. In Russian
39. Spirina EV Morfofiziologicheskie adaptatsii *Rana ridibunda* Pall. pod vliyaniem zagryazneniya [Morphophysiological adaptations of *Rana ridibunda* Pall. under the influence of pollution]. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of Altai State Agricultural University.* 2009;12(62):64-68. In Russian
40. Gajski G, Žegura B, Ladeira C, Novak M, Sramkova M, Pourrut B, Del Bo' C, Milić M, Gutzkow KB, Costa S, Dusinska M, Brunborg G, Collins A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2019;781:130-164. doi: [10.1016/j.mrrev.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.04.002)
41. Erismis UC, Cigerci IH, 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 2013;90:660-665. doi: [10.1007/s00128-013-0991-x](https://doi.org/10.1007/s00128-013-0991-x)

42. Maselli V, Polese G, Rippa D, Ligrone R, Rastogi RK, Fulgione D. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring Provinces. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2010;73:1525-1529. doi: [10.1016/j.ecoenv.2010.05.011](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.011)

*Received 10 March 2021; Revised 21 Juny 2021;
Accepted 27 August 2021; Published 29 September 2021.*

Author info:

Snegin Eduard A, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Director of the Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7574-6910>

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Barkhatov Anatoliy S, Post-Graduate Student, Junior Researcher, Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod 308015, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9996-7251>

E-mail: barkhatov@bsu.edu.ru

Kiselev Vladislav V, Post-Graduate Student, Assistant, Institute of Earth Sciences, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

E-mail: kiselev_v@bsu.edu.ru

Yusupov Sergey R, Post-Graduate Student, Junior Researcher, Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

E-mail: yusupov@bsu.edu.ru

Snegina Elena A, Junior Researcher, Genomic Selection Research Centre, Belgorod National Research University, 85 Pobedy Str., Belgorod 308015, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1789-1121>

E-mail: snegina@bsu.edu.ru