

ДОСЛІДЖЕННЯ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК У ЛІМФОЦИТАХ КОРОПА ЛУСКАТОГО ЗА ДІЇ ПЛЮМБУМУ

М. Я. Онисковець, к. б. н., асистент, Н. В. Качмар, к. с.-г. н., старший викладач
onyskovets.m@gmail.com

Львівський національний аграрний університет, м. Дубляни

Сьогодні важливе місце належить розробці сучасних методів діагностики стану водних біоресурсів. Актуальність таких досліджень визначається значною мірою зростанням антропогенного впливу на природні водойми, де для риб, як кінцевої ланки трофічного ланцюга, виникає чимала токсикологічна загроза [Oliva-Teles A., 2012]. Найбільшу небезпеку становить забруднення водойм Плюмбумом, який навіть у порівняно малих кількостях може негативно впливати на ДНК найчутливіших клітин — лімфоцитів риб [Lushchak V. I., 2011]. Тому метою нашої роботи було дослідження фрагментації ДНК у лімфоцитах коропа лускатого.

У дослідженнях використовували дворічні особини коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) середньою масою 300 г. Досліди проводили в резервуарах об'ємом 200 л. У кожен експериментальну групу було включено по 5 особин. Досліджували вплив на риб Плюмбуму у концентрації 0,5 і 5 мг/л, що відповідають 5 і 50 гранично допустимим концентраціям (ГДК). Риб витримували у середовищі з додаванням ацетату плюмбуму впродовж 96 год. Риб контрольної групи витримували 96 год у звичайних умовах, без додавання Плюмбуму. Здійснювали постійну аерацію і підтримували температурний режим води на рівні 18–20 °С. Кров забирали за допомогою пастерівської піпетки із серця риб. Із крові виділяли лімфоцити центрифугуванням у градієнті густини фікол-верографін.

Дослідження фрагментації ДНК методом ДНК-комет проводили згідно з Collins A. R. et al. (1997). Суспензію лімфоцитів інкубували в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР 0,01 М фосфатно-буферний розчин, рН 7,2–7,4), після цього клітини осаджували центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 2 хв. Потім клітини ресуспендували в ЗФР до концентрації 3×10^4 клітин/мл. До 0,5 мл суспензії клітин додавали 1,5 мл 1 %-ної агарози. Одержану суспензію наносили на охолоджене предметне скельце. На скельця, покриті агарозою зі суспензією лімфоцитів, наносили буфер лізису (30 мМ ЕДТА, 0,5% додецилсульфат натрію, рН 8,0) протягом 4 год за температури 50 °С для того, щоб зруйнувати мембрани клітин. Далі їх промивали ТВЕ-буфером (90 мМ трис, 2 мМ ЕДТА, 90 мМ борна кислота, рН 8,5) протягом 2 год, після цього здійснювали електрофорез у ТВЕ-буфері (25 хв, 0,55 В/см²). Після електрофорезу зразки фарбували протягом 1 год 2,5мкг/мл розчином пропідій йодиду. Під час мікроелектрофорезу лізатів клітин фрагментована ядерна ДНК утворює на електрофореграмі своєрідний ореол, який схожий на хвіст комети. Вважається, що розміри хвоста комети позитивно корелюють зі ступенем фрагментації ДНК. Візуалізацію результатів проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа («Karl Zeiss», Німеччина). Комети класифікували із використанням стандартної таблиці співвідношення розмірів «голови» та «хвоста» ДНК-комет.

Статистичне опрацювання результатів проводили за допомогою програми Statistk з використанням t-тесту Стьюдента. Рівень вірогідності отриманих результатів встановлювали за $P < 0,05-0,001$.

Встановлено, що у риб контрольної групи найбільше було комет нульового типу (92,5 %), а решта класів були представлені у слідових кількостях. За дії 5 ГДК Плюмбуму найбільша частка належала кометам нульового класу, які характеризуються практично повною відсутністю дволанцюгових розривів ДНК. Також відмічалася тенденція до зростання вмісту фрагментованої ДНК у виявлених кометах четвертого класу за умов впливу 5 ГДК Плюмбуму. У той же час 50 ГДК Плюмбуму призводили до значних змін у кількості ДНК-комет усіх класів. Так, кількість ДНК-комет нульового класу знизилася на 11,5 %. Частка інших класів зросла: для першого класу цей показник збільшився у 2,3; для другого — у 2,5; для третього — у 3,5; а для четвертого — аж у 9,8 разу. І хоча в загальній кількості частка всіх цих комет не була значною, але тенденція до зростання рівня ушкодження ДНК за дії досліджуваного важкого металу є незаперечною.

Отже, встановлено дозозалежне зростання ступеня фрагментації ДНК, що виявлялося у збільшенні кількості комет вищих класів лімфоцитів коропів, які піддавалися впливу Плюмбуму. Отримані результати можна пояснити значною пенетраційною здатністю Плюмбуму, який легко проходить не тільки крізь плазматичну, а й крізь ядерну мембрану клітин. При цьому цілком імовірно є механізм токсичної дії Плюмбуму на ДНК, при якому він здатний замінити йони Магнію в активних центрах ензимів, відповідальних за репарацію двониткових розривів ДНК [Sanyal G., Doig P., 2012]. Також можливим є розрив нековалентних зв'язків у ДНК внаслідок взаємодії з йонами Плюмбуму, що може робити її більш доступною для дії неспецифічних і специфічних рестриктаз.

Концентрація Плюмбуму, що відповідала 5 ГДК, не викликала істотних змін у кількості ДНК-комет мононуклеарних лейкоцитів коропа лускатого порівняно з контролем, тоді як 50 ГДК спричиняла вірогідне зростання рівня фрагментації ДНК, що відображалася у збільшенні кількості комет вищих класів. Результати нашого дослідження можуть мати практичне застосування при вирішенні проблем збереження та відновлення популяцій промислових риб у природному середовищі існування.