

БІОХІМІЯ

УДК 577.391:576.367:616

**КОМЕТ-АНАЛІЗ СТУПЕНЯ УШКОДЖЕННЯ ДНК ЛІМФОЦИТІВ
КРОВІ *CYPRINUS CARPIO* L. ЗА ДІЇ ЙОНІВ СВИНЦЮ**

М. Онисковець

*Львівський національний аграрний університет
вул. Володимира Великого, 1, Дубляни 80381, Україна
e-mail: Onyskovets_M@mail.ru*

Наведено результати досліджень рівня дволанцюгових розривів ДНК у лімфоцитах коропа лускатого за дії 2, 5 та 50 гранично допустимих концентрацій свинцю за допомогою методу ДНК-комет. У разі додавання свинцю в концентрації 0,2 та 0,5 мг/л не відбувалося вірогідних змін у кількості ДНК-комет мононуклеарних лейкоцитів коропа лускатого усіх класів, тоді як 5 мг/л свинцю спричиняло достовірне зростання рівня фрагментованої ДНК, що відображалось у збільшенні кількості комет вищих класів. Таким чином, встановлено дозозалежне зростання рівня розривів ДНК, що проявлялося у збільшенні кількості комет вищих класів у дослідних зразках.

Ключові слова: ДНК-комети, фрагментація ДНК, лімфоцити, короп, свинець.

При вирішенні проблем збереження та відновлення популяцій промислових риб у природному середовищі існування 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 [3, 10, 11, 18]. З літературних джерел відомо, що найбільшу небезпеку становить забруднення водойм важкими металами, і в першу чергу свинцем, який навіть у порівняно малих кількостях може негативно впливати на організм водяних тварин [1, 5, 6, 9].

У наших попередніх дослідженнях було виявлено, що йони свинцю викликають зниження РНА-індукованої проліферативної активності Т-лімфоцитів у реакції баластної трансформації лімфоцитів, що може бути наслідком імунотоксичної дії свинцю [8]. Таким чином, нами було висунуто припущення про потенційний токсичний вплив йонів свинцю на ДНК найчутливіших до досліджуваного важкого металу клітин – лімфоцитів. Необхідно було з'ясувати, як впливають йони Pb^{2+} на фрагментацію ДНК лімфоцитів. Використані нами концентрації йонів свинцю були обрані відповідно до даних, наведених у літературі, які стосувалися впливу свинцю на організм риб [2, 4, 7]. Як відомо, метод ДНК-комет дає змогу виявляти пошкодження на клітинному рівні, тому знайшов широке застосування для дослідження впливу різних екстремальних чинників зовнішнього середовища на організм тварин [14, 17, 19]. Для перевірки даної гіпотези було проведено дослідження рівня фрагментованої ДНК у лімфоцитах коропа лускатого за дії йонів свинцю за допомогою методу ДНК-комет.

Матеріали та методи

У дослідженнях використовували дворічні особини коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) середньою масою 300–350 г. Досліди проводили в резервуарах об'ємом 200 л. У кожну експериментальну групу було включено по 7 особин. Досліджували вплив йонів свинцю (Pb^{2+}) у концентрації 0,2; 0,5 і 5 мг/л, що відповідають 2, 5 і 50 гранично допусти-

мим концентраціям (ГДК) на організм риби. Риб витримували в середовищі з додаванням ацетату свинцю впродовж 96 год. Контрольну групу риб витримували 96 год у звичайних умовах, без додавання йонів свинцю. Здійснювали постійну аерацію і підтримували температурний режим води на рівні 18–20°C.

Кров забирали за допомогою пастерівської піпетки зі серця риб. Із крові риб виділяли лімфоцити шляхом центрифугування у градієнті густини фікол-верографін [12].

Дослідження фрагментації ДНК методом ДНК–комет проводили згідно з Collins і співавт. [13]. 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 при температурі 50°C 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 V/cm²). Після електрофорезу зразки фарбували протягом 1 год 2,5 мкг/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 [15]. Візуалізацію результатів проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа («Karl Zeiss», Німеччина). Комети класифікували із використанням стандартної таблиці співвідношення розмірів «голови» та «хвоста» ДНК–комет [20].

Статистичне опрацювання результатів проводили за допомогою програми Statistik з використанням t–тесту Стьюдента. Рівень вірогідності отриманих результатів встановлювали при $p < 0,05$ – $0,001$.

Результати і їхнє обговорення

Виявлено (див. таблицю), що в контрольній групі тварин найбільше було комет 0 типу (92,5%), а решта класів були представлені у слідових кількостях. Концентрація йонів свинцю, що відповідала 2 ГДК, не викликала вірогідних змін у кількості ДНК–комет усіх класів, тож переважна кількість клітин мала нормальну структуру ДНК, що представлено на рис. 1.

ДНК–комети різних класів лімфоцитів крові коропа лускатого за дії йонів свинцю, % ($M \pm m$; $n=7$)

Клас комет	Контроль	Концентрація свинцю, ГДК		
		2	5	50
0	92,5±3,2	91,2±2,8	92±3,1	81,7±2,4
I	5,5±0,3	7,4±0,8	6,3±0,5	12,4±0,8***
II	1,2±0,1	1,0±0,2	1,5±0,3	3,1±0,2**
III	0,8±0,2	0,4±0,1	0,2±0,1	2,8±0,4**
IV	0,6±0,1	0,2±0,1	0,8±0,2	5,9±0,8***

Примітка. ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – порівняно з контролем.

За дії 5 ГДК йонів свинцю спостерігали аналогічну до вищеописаної картини впливу на ДНК лімфоцитів коропа лускатого. Зокрема, найбільша частка знову належала кометам нульового класу, які характеризуються практично повною відсутністю дволанцюгових розривів ДНК. Також не було виявлено вірогідних змін у жодному з класів комет, хоча відзначалася тенденція до зростання вмісту фрагментованої ДНК у виявлених кометах четвертого класу (таблиця і рис. 2). У той же час 50 ГДК йонів свинцю призводили до значних

змін у кількості ДНК-комет усіх класів. Так, кількість ДНК-комет нульового класу знизилася на 11,5%. Частка інших класів зросла: наприклад, 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 йонів досліджуваного важкого металу є незаперечною.

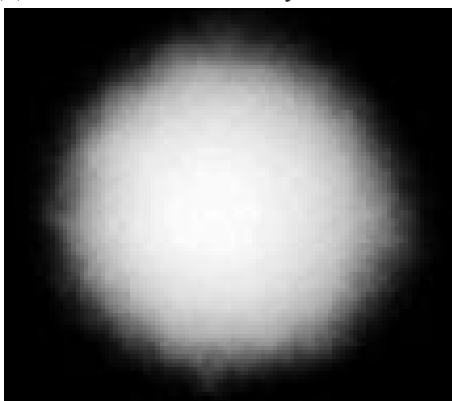


Рис. 1. Типова комета нульового класу за дії 2 ГДК йонів свинцю.

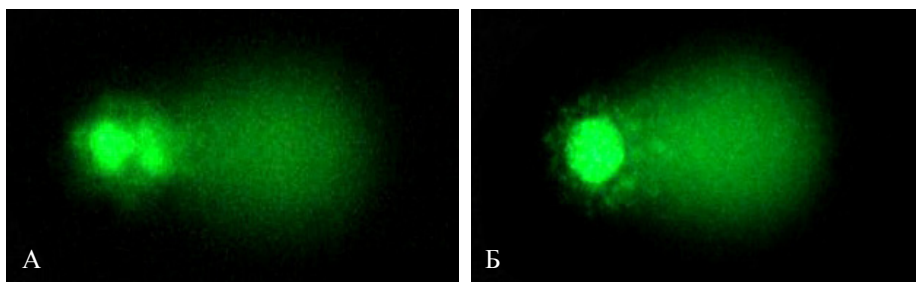


Рис. 2. Типові ДНК-комети четвертого класу за дії 2 та 5 ГДК йонів свинцю (А – 2 ГДК; Б – 5 ГДК).

Було встановлено дозозалежне зростання ступеня фрагментації ДНК, що виявлялося у збільшенні кількості комет вищих класів лімфоцитів коропа, які піддавалися впливу йонів свинцю. Отримані результати можна пояснити значною пенетраційною здатністю свинцю, який легко проходить не тільки крізь плазматичну, а й крізь ядерну мембрану клітин [16]. При цьому цілком імовірно є механізм токсичної дії свинцю на ДНК, при якому він здатний заміщати йони магнію в активних центрах ферментів, відповідальних за репарацію двониткових розривів ДНК [21]. Також можливим є розрив нековалентних зв'язків у ДНК внаслідок взаємодії з йонами свинцю, що може робити її більш доступною для дії неспецифічних і специфічних рестриктаз.

Отже, концентрація йонів свинцю, що відповідала 2 і 5 ГДК, не викликала вірогідних змін у кількості ДНК-комет мононуклеарних лейкоцитів коропа лускатого порівняно з контролем, тоді як 50 ГДК спричиняли достовірне зростання рівня фрагментації ДНК, що відобразалося у збільшенні кількості комет вищих класів у дослідних риб.

Враховуючи той факт, що на сьогодні важливе місце належить розробці сучасних методів діагностики стану водних біоресурсів, то результати нашого дослідження можуть мати практичне застосування при вирішенні проблем збереження та відновлення популяцій промислових риб у природному середовищі існування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Брагинский Л. П., Линник П. Н. К методике токсикологического эксперимента с тяжелыми металлами на гидробионтах // Гидробиол. журнал. 2003. Т. 39. № 1. С. 92–104.
2. Габиров М. М., Мусаев Б. С., Мурадова Г. Р. Влияние солей кадмия и свинца на некоторые показатели липидного обмена органов сеголетков карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Вестник ДГУ. Ест. науки. 2007. № 5. С. 45–47.
3. Гладышев М. И., Грибовская И. В., Иванова Е. А. Содержание металлов в экосистеме и окрестностях рекреационного и рыболовного пруда Бугач // Водные ресурсы. 2001. Т. 28. № 3. С. 320–328.
4. Зінковська Н. Г. Функціонування антиоксидантних систем у крові риб при інтоксикації йонами міді, цинку, марганцю і свинцю: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. Чернівці, 2003. 21 с.
5. Леонова Г. А., Сутурин А. Н., Ломоносов И. С. и др. Токсическое действие соединений свинца на гидробионты и водоплавающих птиц: обзор // Гидробиол. журнал. 1992. Т. 28. № 4. С. 68–75.
6. Мур Дж. Тяжелые металлы в природных водах. М.: Мир, 1987. 285 с.
7. Мусаев Б. С., Рабаданова А. И., Мурадова Г. Р. и др. Влияние хронической интоксикации ацетатом свинца на фракционный состав белков, содержание липидов и антиоксидантную активность головного мозга сеголетков карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Токсиколог. вестник. 2009. № 6. С. 8–12.
8. Онисковець М. Я. Дослідження функціональної активності лімфоцитів *Cyprinus carpio* L. за умов підвищеної концентрації йонів свинцю у водному середовищі // II Міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених (Донецьк, 2011). С. 105–106.
9. Пилипенко Ю. В. Оценка пищевого качества рыб-биомелиораторов на содержание тяжелых металлов // Гидробиол. журнал. 2007. Т. 43. № 5. С. 64–77.
10. Романенко В. Д. Основы гидроэкологии. К.: Обереги, 2001. 728 с.
11. Barata C., Markich S. J., Baird D. J. et al. **The relative importance of water and food as cadmium source to *Daphnia magna* Straus** // Aquatic Toxicol. 2002. Vol. 61. P. 143–154.
12. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // **Stand. J. Clin. Lab. Invest.** 1968. Vol. 21. P. 77–83.
13. Collins A. R., Dobson V. L., Dusinska M. et al. The comet assay: what can it really tell us? // Mutation Research. 1997. Vol. 375. P. 183–193.
14. Gopalakrishna P., Khar A. Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1995. Vol. 30. P. 69–73.
15. Heaton P. R., Ransley R., Charlton C. J. et al. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes // *J. Nutrition.* 2002. Vol. 132. N 6. P. 1598–1603.
16. Karbownik M., Tan D. X., Reiter R. J. Melatonin reduces the oxidation of nuclear DNA and membrane lipids induced by the carcinogen delta-aminolevulinic acid // *Int. J. Cancer.* 2000. Vol. 88. N 1. P. 7–11.
17. Merk O., Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity // Environmental and Molecular Mutagenesis. 1999. Vol. 33. P. 167–172.
18. Oliva-Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish // *J. Fish Diseases.* 2012. Vol. 35. N 2. P. 83–108.
19. Olive P. L. The comet assay. An overview of techniques // *Methods in Molecular Biology.* 2001. Vol. 203. P. 179–194.

20. Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. Single cell gel electrophoresis: methodology and applications // J. Chromatography. 1999. Vol. 722. N 1–2. P. 225–254.
21. Sanyal G., Doig P. Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery // Expert Opinion Drug Discovery. 2012. Vol. 7. N 4. P. 327–339.

Стаття: надійшла до редакції 09.10.12

доопрацьована 19.12.12

прийнята до друку 20.12.12

ANALYSIS OF THE DNA-DAMAGE LEVEL IN LYMPHOCYTES OF THE *CYPRINUS CARPIO* L. DUE TO LEAD IONS INFLUENCE

M. Onyskovets

*Lviv National Agrarian University
1, Volodymyr Velykyj St., Dubliany 80381, Ukraine
e-mail: Onyskovets_M@mail.ru*

In the article results of the research level of the double-stranded DNA breaks in lymphocytes of carp flake for 2, 5 and 50 MPC lead using comet assay method were presented. Using of the lead ions in concentrations of 0.2 and 0.5 mg/l did not cause significant changes in the number of DNA comets in mononuclear leukocytes of carp flake. At the same time 5 mg/l of lead ions caused a statistically significant increase of the DNA breaks that was shown by high amount of the DNA-comets of the higher classes. Thereby, it was found that increase in DNA breaks has dose-dependent manner related to the lead ions concentration.

Keywords: DNA comet, fragmentation of DNA, lymphocytes, carp, lead.

КОМЕТ-АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ *CYPRINUS CARPIO* L. ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ СВИНЦА

М. Онисковец

*Львовский национальный аграрный университет
ул. Владимира Великого, 1, Дубляны 80381, Украина
e-mail: Onyskovets_M@mail.ru*

Приведены результаты исследований уровня двухцепных разрывов ДНК в лимфоцитах карпа чешуйчатого при действии 2, 5 и 50 ПДК свинца с помощью метода ДНК-комет. При добавлении свинца в концентрации 0,2 и 0,5 мг/л не происходили достоверные изменения в количестве ДНК-комет мононуклеарных лейкоцитов карпа чешуйчатого всех классов. Тогда как 5 мг/л свинца вызывало достоверное повышение уровня фрагментированной ДНК, что отражалось на увеличении количества комет высших классов. Таким образом, установлено дозозависимое повышение уровня разрывов ДНК, что проявлялось в увеличении количества комет высших классов в опытных образцах.

Ключевые слова: ДНК-кометы, фрагментация ДНК, лимфоциты, карп, свинец.