

УДК 547.915: 639.215.2

Ю. І. Сенник, В. О. Хоменчук, В. З. Курант, В. В. Грубінко

**РОЛЬ ФОСФОЛІПІДІВ ЗЯБЕР РИБ У ФОРМУВАННІ
ТОКСИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ДІЇ ЙОНІВ
КАДМІЮ**

Досліджено зміни вмісту ліпідів у зябрах коропа та щуки за дії 0,5 та 2 рибогосподарських ГДК йонів кадмію. Встановлено, що за дії токсиканту спостерігаються зміни загального вмісту ліпідів, окремих фракцій фосфоліпідів та їх співвідношення. На підставі одержаних даних спрогнозовано розвиток адаптації фосфоліпідного профілю клітин зябер риб до дії токсиканту.

Ключові слова: короп, щука, фосфоліпіди, кадмій.

Відомо, що у гідробіонтів наявні певні біохімічні механізми токсикорезистентності до йонів металів [11, 28], одним з них є перебудова ліпідного обміну. Більшість досліджень щодо впливу йонів металів на ліпідний обмін проводили на вищих хребетних тваринах [7, 16], тоді як у риб вивчали переважно структурно-функціональну роль ліпідів у адаптації до фізичних та біологічних чинників [8, 17].

З огляду на те, що основна частина металів надходить у організм риб через зябра [30], а одним із механізмів підтримання йонного гомеостазу в їх організмі є структурна перебудова біліпідного шару клітинних мембран цієї тканини [21], завданням роботи було встановлення співвідношення основних фракцій фосфоліпідів клітин зябрового епітелію коропа і щуки за дії підвищеної концентрації йонів кадмію.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus caprio* L.) та щуки (*Esox lucius* L.) середньою масою 300—350 г. Риб утримували в акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою за таких умов: вміст O_2 — $7,5 \pm 0,5$ мг/дм³, вміст CO_2 — $2,5 \pm 0,3$ мг /дм³, рН $7,8 \pm 0,1$.

Досліджували ліпідний склад клітин зябрового епітелію за дії йонів Cd^{2+} в концентрації 0,005 і 0,02 мг/дм³, що відповідала 0,5 та 2,0 рибогосподарським ГДК (допорогова і сублетальна) [1]. Необхідну концентрацію йонів металу у воді створювали внесенням солі $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ кваліфікації «х. ч.».

© Ю. І. Сенник, В. О. Хоменчук, В. З. Курант, В. В. Грубінко, 2016

Період аклімації риб у токсичних умовах становив 14 діб, що є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-фактору.

Безпосередньо перед дослідженням риб забивали шляхом декапітації та проводили екстирпацію зябер. Зябра гомогенізували в охолодженому розчині такого складу: 0,22 М сахароза, 10^{-4} М ЕДТА та 0,01 М тріс-НСІ (рН 7,2) у співвідношенні тканина : розчин 1 : 5. Ліпіди екстрагували додаванням до гомогенату хлороформ-метанолової суміші у співвідношенні 2 : 1 за методом Фолча [19]. Неліпідні домішки з екстракту видаляли шляхом відмивання 1%-ним розчином КСІ [5].

Фосфоліпіди розділяли на окремі фракції методом висхідної тонкошарової хроматографії на пластинках «Sorbfil». Для визначення фракцій фосфоліпідів пластинки елюювали у суміші хлороформу, метанолу, льодяної оцтової кислоти і дистильованої води у співвідношенні 60 : 30 : 7 : 3. Виявлено такі фракції: лізофосфатидилхолін (ЛФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилхолін (ФХ), сфінгомієлін (СМ) та фосфатидилінозитол (ФІ). Хроматограми після висушування проявляли у камері, насиченій парами йоду. Для ідентифікації окремих фракцій використовували очищені стандарти. Кількість фосфоліпідів визначали за методом Васьковського [34].

Вміст кадмію встановлювали після спалювання зябер у перегнаній нітратній кислоті у співвідношенні 1 : 5 (маса : об'єм) на атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115 і виражали в нг/мг білка. Вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) вимірювали після реакції з 2-тіо-барбітуратною кислотою [5, 6]. Всі отримані результати оброблено статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента.

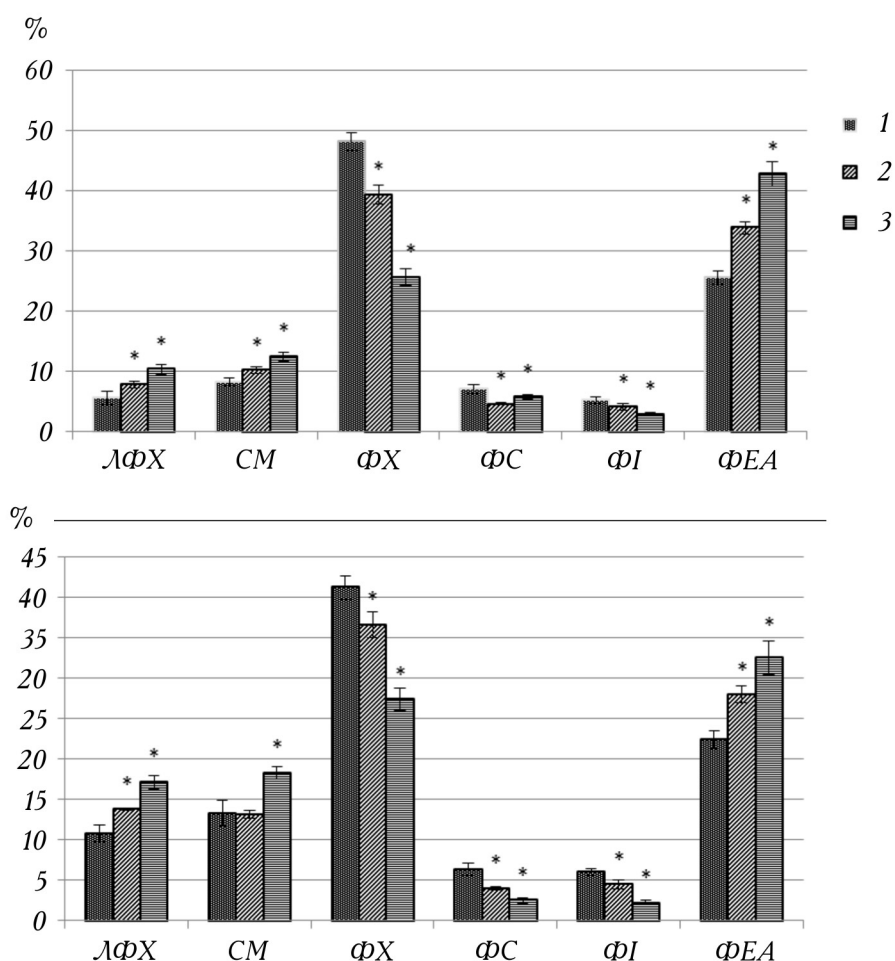
Результати досліджень та їх обговорення

Встановлено, що зміни вмісту досліджуваних фракцій фосфоліпідів дозозалежні (рис. 1).

За впливу 0,5 і 2 ГДК йонів Cd^{2+} вміст ФХ знизився у коропа в 1,23 і 1,88 разу, а у щуки — в 1,13 і 1,51 разу, кількість ЛФХ зростає відповідно в 1,40 і 1,84 та в 1,28 і 1,59 разу. Такі зміни можуть бути викликані активацією йонами металу фосфоліпази A_2 [32].

Разом з тим зниження вмісту ЛФХ може бути пов'язано з інтенсифікацією його використання у синтезі СМ за участю церамідхолінфосфотрансферази [27]. Опосередкованим підтвердженням цього є збільшення накопичення останнього у коропа за дії 0,5 і 2 ГДК відповідно в 1,23 і 1,51 разу, натомість у зябрах щуки його кількість збільшилась в 1,38 разу лише за дії 2 ГДК. Зростання вмісту СМ у клітинах сприяє ущільненню їх мембран і, відповідно, зменшенню проникності для йонів металу [22].

Зростання кількості ФЕА у зябрах коропа і щуки відповідно в 1,32 і 1,25 разу за дії 0,5 ГДК та в 1,68 і 1,45 разу за впливу 2 ГДК ($p < 0,05$) очевидно є наслідком інгібування йонами Cd^{2+} специфічних метилаз [23], які каталізу-

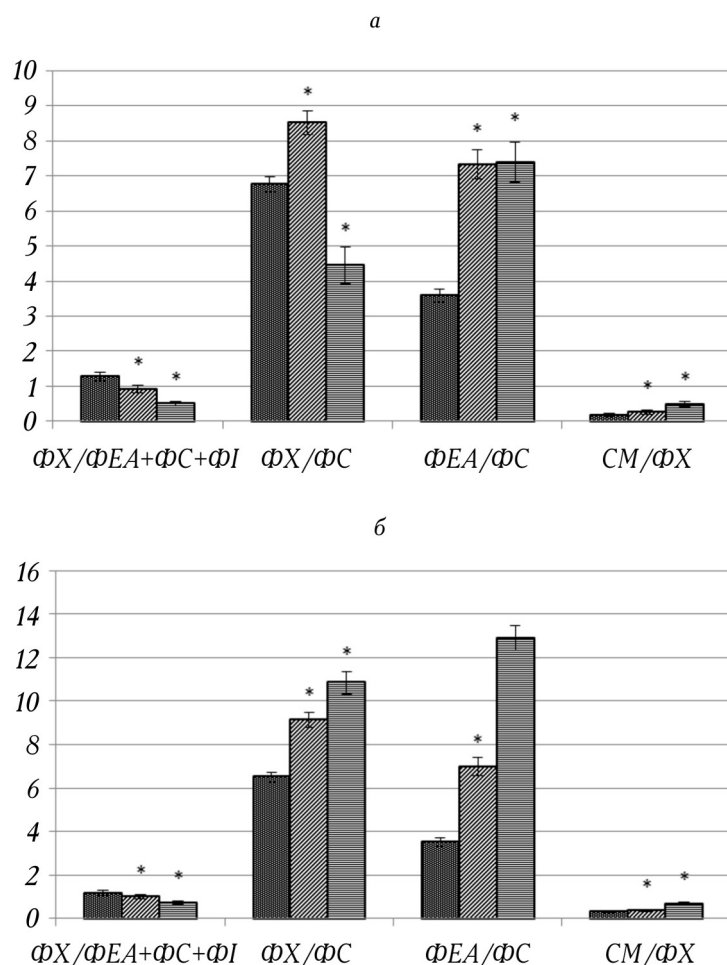


1. Вміст окремих фракцій фосфоліпідів у зябрах коропа (а) та щуки (б) за дії іонів кадмію ($M \pm m, n = 5$). Тут і на рис. 2: 1 — контроль; 2 — 0,5 ГДК; 3 — 2,0 ГДК.

ють синтез ФХ з ФЕА [2]. Разом з тим збільшення його вмісту може бути обумовлено зменшенням вмісту ФС внаслідок активації фосфатидилсериндекарбоксилази [3].

Загальна тенденція до зменшення вмісту ФІ у зябрах досліджуваних риб, ймовірно, є наслідком зростання активності фосфоліпази A_2 , адже відомо, що ФІ є неспецифічним субстратом цього ферменту [26] та фосфоліпази С [29]. Оцінку біологічних змін фосфоліпідного спектру здійснювали на основі відношення вмісту фракцій (рис. 2).

Заслуговує на увагу той факт, що за дії підвищеної концентрації кадмію значно зростає відношення ФЕА/ФС, що свідчить про інтенсифікацію синтезу ФЕА з ФС. Зростання показника ФХ/ФС, очевидно, є наслідком інтенсифікації перетворення ФС у ФЕА та гідролізу ФХ. Зростання відношення



2. Відношення вмісту фракцій фосфоліпідів в зябрах коропа (а) і щуки (б) за дії йонів кадмію ($M \pm m$, $n = 5$).

СМ/ФХ у зябрах підтверджується активацією церамідхолінфосфотрансферази та свідчить про перерозподіл фракцій фосфоліпідів зовнішнього шару мембрани.

На підставі отриманих результатів можна прогнозувати розвиток адаптації біліпідного шару мембрани зябер коропа та щуки до дії підвищеної концентрації йонів кадмію за трьома напрямками:

- накопичення ФЕА призводить до ущільнення клітинної мембрани та зменшення надходження токсиканту у клітину [22],
- зниження вмісту ФІ може бути компенсаторною реакцією на розвиток гіперкальцемії на фоні зростання концентрації йонів кадмію [9],

Зміни відношення ФХ/ФЕА, коефіцієнту здатності до окиснення, кількість накопиченого металу та вміст продуктів ПОЛ у зябрах риб за дії йонів кадмію ($M \pm m, n = 5$)

Види риб	Кількість токсиканту	ФХ/ФЕА	Вміст Cd ²⁺ в зябрах, нг/мг білка	КЗО	ТБК-продукти, нмоль/г
Короп	Контроль	1,88	197,75	0,61	5,05
	0,5 ГДК	1,16	250,63*	0,74	6,49*
	2 ГДК	0,61	340,73*	1,06	9,74*
Щука	Контроль	1,84	298,21	0,53	5,48
	0,5 ГДК	1,31	334,83*	0,59	6,13*
	2 ГДК	0,84	446,79*	0,69	7,94*

* Різниця з контролем статистично достовірна.

що призвело б до подальшої активації Ca²⁺-залежної фосфоліпази A₂ [33],

— накопичення СМ сприяє збільшенню мікров'язкості біліпідного шару та, відповідно, обмеженню надходження йонів металу [18].

Із одержаних результатів видно, що за інтоксикації йонами кадмію у коропа і щуки відбуваються схожі зміни фосфоліпідного складу зябер. Для перевірки ефективності таких змін було визначено рівень накопичення металу у зябрах та інтенсивність пероксидації ліпідів, оскільки, відомо, що від ліпідного складу мембрани залежить її проникність [25] та активність ПОЛ [12].

Для встановлення зв'язку між кількістю накопиченого металу, вмістом ТБК-активних продуктів та змінами фосфоліпідного складу мембран зябер розраховано співвідношення ФХ/ФЕА, що вказує на проникність мембран [13], а також коефіцієнт здатності ліпідів мембран до окиснення (КЗО) = (ФІ + ФС + ФЕА)/(ΛФХ + СМ + ФХ), тобто співвідношення таких, що легко піддаються пероксидації, до таких, що окиснюються важко [4] (таблиця).

Відмічена зворотна залежність між відношенням ФХ/ФЕА та кількістю накопиченого металу. Так, за дії 0,5 і 2 ГДК кадмію у зябрах коропа цей показник знизився відповідно в 1,62 і у 3,13 разу, а у щуки — 1,40 і 2,19 разу. У той же час, кількість металу у зябрах коропа зросла в 1,27 і 1,74 разу, у щуки — в 1,12 і 1,50 разу. Отже, незважаючи на адаптивну роль ФЕА, його значне накопичення з одночасним гідролізом ФХ фосфоліпазою A₂ сприяє його появі на зовнішньому шарі клітинної мембрани [15], внаслідок чого змінюється структура біліпідного шару [14] і зростає його проникність [25].

Аналогічна видова специфічність спостерігається при порівнянні КЗО і вмісту ТБК-АП. Так, за дії 0,5 і 2,0 ГДК у зябрах коропа значення КЗО зросло відповідно в 1,21 і 1,74 разу, а вміст ТБК-АП — в 1,28 і 1,93 разу. У зябрах щуки КЗО за дії 0,5 і 2 ГДК зріс відповідно в 1,08 і 1,31 разу, а вміст ТБК-АП

— в 1,12 і 1,45 разу. Отримані результати свідчать про залежність активності ПОЛ у зябрах досліджуваних риб від зміни фосфоліпідного складу мембран їх клітин.

Ймовірно, такі міжвидові відмінності в адаптації до дії йонів кадмію обумовлені більш високою індукцією синтезу металотіонеїнів в організмі щуки порівняно з коропом [20] і різним вмістом СМ, адже відомо, що накопичення цього фосфоліпиду інгібує фосфоліпазу А₂ [10] та знижує рівень ПОЛ [24].

Висновки

Йони кадмію викликають структурно-функціональні зміни у мембранах зябер коропа і щуки. Зміни вмісту окремих фракцій фосфоліпідів викликані як безпосередньою дією Cd²⁺, так і мобілізацією пулу відповідних фосфоліпідів з метою структурної модуляції ліпідного бішару у напрямку протидії токсичному чиннику. Відмінності адаптаційних можливостей коропа і щуки обумовлені видовою специфічністю інтенсивності метаболізму фосфоліпідів та абсолютним вмістом їх окремих фракцій.

**

Исследованы изменения содержания липидов в жабрах карпа и щуки при воздействии 0,5 и 2 ПДК_{рыбхоз} ионов кадмия. Установлено, что это воздействие вызывает изменение общего содержания липидов, отдельных фракций фосфолипидов и их соотношения. На основании полученных данных спрогнозировано развитие адаптации клеток жабр рыб к воздействию токсиканта.

**

The changes in lipid content in the gills of carp and pike under impact of cadmium ions was studied. Toxic impact caused changes of total lipids content, individual fractions of phospholipids and their ratio.

**

1. Беспмятнов Г.П., Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. — Л.: Химия, 1985. — 304 с.
2. Васьковский В.Е. Липиды // Соросовский образоват. журн. — 1997. — № 3. — С. 1—32.
3. Климов А.Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. Часть 1. — СПб.: Питер, 1999. — С. 55—56.
4. Лесникова Л.Н. Стрессорные изменения физиологических свойств эритроцитов и их коррекция с помощью экстракта из туники асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*) // Автореф. дис... канд. биол. наук. — Владивосток, 2006. — 22 с.
5. Прохорова М.И. Методы биохимического исследования — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. — 222 с.

6. *Стальная И.Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // *Современные методы в биохимии.* — М.: Медицина, 1977. — С. 63—64.
7. *Финагина О.Л., Печенова Н.В.* Холестерин и биологические мембраны. — М.: Мир, 1991. — 134 с.
8. *Шульман Г.Е., Аболмасова Т.И., Столбов А.Я.* Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // *Успехи совр. биол.* — 1993. — Т. 113, № 5. — С. 576—580.
9. *Adiele R.C., Stevens D., Kamunde C.* Reciprocal enhancement of uptake and toxicity of cadmium and calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver mitochondria // *Aquat. Toxicol.* — 2010. — Vol. 96. — P. 319—327.
10. *Audubert F., Klapisz E., Berguerand M. et al.* Differential potentiation of arachidonic acid release by rat A₂ adrenergic receptor subtypes. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1999. — Vol. 1437. — P. 265—276.
11. *De Conto C.C., Petit-Ramel M., Faure R. et al.* Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues // *Comp. Biochem. Physiol. C.* — 1999. — Vol. 122. — P. 345—352.
12. *Corongiu F.P., Poli G., Dianzani M.U. et al.* Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions *in vivo* // *Chem.-Biol. Interactions.* — 1986. — Vol. 59 — P. 147—155.
13. *Dennis E., Li Z., Jacobs R.L.* Hepatic phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282, N 46. — P. 33237—33241.
14. *Dowhan W., Bogdanov M.* Functional roles of lipids in membranes // *New Comprehensive Biochem.* — 2002. — Vol. 36. — P. 1—35.
15. *Emoto K., Toyamasorimachi N., Karasuyama H. et al.* Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells // *Exp. Cell Res.* — 1997. — Vol. 232. — P. 430—434.
16. *Gundermann K.-J. Fd.* The «essential» phospholipids as a membrane therapeutic // *Szczecin: Polish Section of European Society of biochemical pharmacology*, 1993. — P. 2—17.
17. *Hazel J.R.* Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? // *Annu. Rev. Physiol.* — 1995. — Vol. 57. — P. 19—42.
18. *Henderson R. J., Tocher D.R.* The lipid composition and biochemistry of freshwater fish // *Prog. Lipid Res.* — 1997. — P. 281—347.
19. *Hokin L.E., Hexum T.D.* Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase IX. On the role of phospholipids in the enzyme // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1992. — Vol. 151, N 2. — P. 58—61.
20. *Kille P., Kay J., Leaver M., George S.* Induction of piscine metallothionein as a primary response to heavy metal pollutants: applicability of new sensitive molecular probes // *Aquat. Toxicol.* — 1992. — Vol. 22. — P. 279—286.
21. *Killian J.A., van Meer G.* The «double life» of membrane lipids // *EMBO Reports.* — 2001. — Vol. 21. — P. 91—95.

22. Knoll W., Frank C.W., Heibel C. et al. Functionality the red lipid bilayers // J. Biotechnol. — 2000. — Vol. 74. — P. 137—158.
23. Kodaki T., Yamashita S. Phosphatidylethanolamine methylation pathway // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 15428—15435.
24. Koizumi T., Shirakura H., Kumagai H. et al. Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane // Toxicology. — 1996. — Vol. 114. — P. 125—134.
25. Li Z., Agellon L.B., Allen T.M. et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and a state of hepatitis // Cell Metabolism. — 2006. — Vol. 3 — P. 321—331.
26. Mahadevappa V.G., Holub B.J. The molecular species composition of individual diacylphospholipids in human platelets // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 713 — P. 73—79.
27. Merrill A.H. Jr., Jones D.D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism // Ibid. — 1990. — Vol. 1044. — P. 1—12.
28. Panfoli I., Burlando B., Viarengo A. Effects of heavy metals on phospholipase C in gill and digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Comp. Biochem. Physiol. B. — 2000. — Vol. 127. — P. 391—397.
29. Patton J.S. The effect of pressure and temperature on phospholipid and triglyceride fatty acids of fish white muscle: a comparison of deepwater and surface marine species // Ibid. — 1995. — Vol. 52. — P. 105—110.
30. Protasowcki M., Chodyniecki A. Biochumulacja Cd, Pb, Cu, Zn w karpin — *Cyprinus carpio* L. w zaleznosci od stezeja w wodzie i czasu ekspozycji // Lesz. Nauk. Rub. Mor. i Technol. Zum. — 1988. — Vol. 17. — P. 69—84.
31. Rustenbeck I., Münster W., Lenzen S. Relation between accumulation of phospholipase A₂ reaction products and Ca²⁺ release in isolated liver mitochondria // Biochim. Biophys. Acta. — 1996. — Vol. 1304. — P. 129—138.
32. Thomas J.P., Geiger P.G., Maiorino M. et al. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins // Ibid. — 1990. — Vol. 1045. — P. 252—260.
33. Vaskovsky V.E., Kastetsky E.V., Vasedin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatogr. — 1985. — Vol. 114. — P. 129—141.