

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

Ліпідний склад ядер клітин зябер коропа (*Cyprinus carpio* L.) при дії підвищених концентрацій іонів цинку та кадмію

(Представлено академіком НАН України В. Д. Романенком)

Досліджено зміни фосфоліпідного складу ядер клітин зябер при експозиції 0,5 й 2 мг/дм³ Zn²⁺ та 0,005 й 0,02 мг/дм³ Cd²⁺. Вивчено нагромадження цих металів та встановлено активність ПОЛ при дії токсикантів. Встановлено, що зміни досліджуваних показників залежать не лише від кількості металу, а й від його фізико-хімічних характеристик. Розраховано “коефіцієнт токсичності металу”, що відображає характер впливу відповідної концентрації металу.

В організмах гідробіонтів еволюційно сформувалися засоби біохімічної адаптації до хімічних впливів різного типу і рівня. Одним із важливих механізмів адаптивної реакції на дію іонів металів є структурна перебудова ліпідного шару клітинних мембран [1]. Однак незважаючи на актуальність, вплив токсичних стрес-факторів на ліпідний обмін у водних організмів вивчено недостатньо, оскільки більшість досліджень впливу іонів металів на ліпідний обмін здійснено у вищих хребетних наземних тварин, як правило, ці дослідження стосувалися лише зовнішніх клітинних мембран, а не органел [2].

Мета роботи авторів даного повідомлення полягала у вивченні ліпідного складу мембран ядер клітин зябрового епітелію коропа при дії підвищених концентрацій іонів Zn²⁺ й Cd²⁺.

Матеріали та методи дослідження. Досліди проведено на коропах (*Cyprinus carpio* L.) дворічного віку масою 300–350 г. Риб утримували в лабораторних акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою зі стандартними гідрохімічними показниками: вміст O₂ становив (7,5 ± 0,5) мг/дм³; CO₂ — (2,5 ± 0,3) мг/дм³; рН (7,8 ± 0,1).

Досліджували ліпідний склад ядерних мембран при дії іонів кадмію та цинку в концентраціях, що відповідали 0,5 й 2,0 рибогосподарським ГДК, відповідно 0,5 й 2 мг/дм³ для Zn²⁺ та 0,005 й 0,02 мг/дм³ для Cd²⁺ [3]. Необхідні концентрації іонів металів у воді створювали при внесенні солей ZnSO₄·5H₂O та CdCl₂·2,5H₂O кваліфікації “х. ч.”.

Риб під час аклімації не годували. Період аклімації у риб в токсичних умовах становив 14 діб, що є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-фактора [4].

Виділення ядер із зябрових клітин здійснювали методом диференційного центрифугування в градієнті 0,22 М сахарози. Загальні ліпіди екстрагували хлороформно-метаноловою сумішшю в співвідношенні 2 : 1 методом Фолча [5]. Фосфоліпіди розділяли на фракції за методом висхідної одномірної мікротонкошарової хроматографії на пластинках “sorbfil”, рухомою фазою була суміш хлороформ — метанол — льодяна оцтова кислота — дистильована вода у співвідношенні 60 : 30 : 7 : 3. Кількість фосфоліпідів визначали методом Васьковського [6].

Для визначення вмісту цинку та кадмію виділені ядра клітин зябер спалювали в перегнаній нітратній кислоті у співвідношенні 1 : 5 (маса : об'єм). Вміст металів визначали на

атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115 у нг/мг білка. Концентрацію гідропероксидів ліпідів встановлювали методом Мирончика [7].

Усі отримані дані оброблено статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента [8].

Результати та їх обговорення. Отримані результати свідчать про дозозалежність змін фосфоліпідного складу клітинних мембран ядер зябер коропа (табл. 1). При дії допорогової концентрації іонів цинку (0,5 мг/л) спостерігається достовірне зростання вмісту фосфатидилхоліну (ФХ) з одночасним зниженням кількості лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), що є опосередкованим підтвердженням активації в мембранах ядер анаболічних процесів. Зниження вмісту фосфатидилетаноламіну (ФЕА) у 1,29 раза ($p < 0,05$), ймовірно, є результатом активації специфічних метилаз [9]. Достовірне зростання кількості іншого холінвмісного фосфоліпиду сприяє зниженню плинності біліпідного шару та зменшенню проникності мембрани для іонів металів [10].

Вплив Cd^{2+} у допороговій концентрації (0,005 мг/л) на ліпідний склад ядер зябер коропа носить амбівалентний характер. Поряд з активацією синтезу ФХ за участю фосфохолінцитидилтрансферази [11] (оскільки вміст ФЕА практично не відрізняється від контрольних значень) відзначається достовірне зростання кількості ЛФХ, що свідчить про руйнування зовнішнього ліпідного шару мембрани, ймовірно, внаслідок активації іонами металу фосфоліпази (ФЛ) A_2 [12]. Нагромадження сфінгомієліну (СМ), можливо, викликано активацією кадмієм церамідхолінфосфотрансферази [13].

При експозиції іонів цинку (2 мг/л) та кадмію (0,02 мг/л) спостерігаються аналогічні зміни. Зростання вмісту ЛФХ та одночасне зниження ФХ вказує на активацію сублетальною концентрацією токсикантів каталітичної активності ФЛ A_2 [14]. Нагромадження ФЕА, можливо, викликане інгібуванням іонами металів N-метил-фосфатидилетаноламін трансферази [9]. Нагромадження іншого холінвмісного фосфоліпиду, вірогідно, дозволяє знизити надходження токсикантів у органелу.

Акумулявання металів та нагромадження гідропероксидів ліпідів у ядрах клітин епітелію зябер залежить не лише від кількості токсиканту в середовищі, а й від його хімічної активності (табл. 2).

За впливу допорогової концентрації іонів цинку відзначається достовірне зниження вмісту металу та гідропероксидів ліпідів у ядрах зябер коропа. При дії 2 ГДК токсикантів спостерігається достовірне нагромадження іонів Zn^{2+} й Cd^{2+} з одночасним зростанням первинних продуктів ПОЛ. Ці дані свідчать про те, що іони цинку та кадмію активують пероксидацію ліпідів.

Таблиця 1. Вміст фосфоліпідів окремих фракцій в ядрах зябер коропа при дії підвищених концентрацій іонів Zn^{2+} й Cd^{2+} , мг/г ($M \pm m$, $n = 5$)

Метал	Кількість токсиканту	СМ	ЛФХ	ФХ	ФЕА
Zn^{2+}	Контроль	0,23 ± 0,05	0,27 ± 0,05	3,92 ± 0,16	2,11 ± 0,14
	0,5 ГДК	0,38 ± 0,03*	0,22 ± 0,04*	5,99 ± 0,39*	1,63 ± 0,20*
	2 ГДК	0,34 ± 0,06*	0,39 ± 0,06*	2,43 ± 0,08*	2,36 ± 0,13*
Cd^{2+}	Контроль	0,55 ± 0,09	0,2 ± 0,04	5,55 ± 0,16	4,28 ± 0,21
	0,5 ГДК	1,06 ± 0,09*	0,32 ± 0,05*	8,86 ± 0,39*	4,41 ± 0,32
	2 ГДК	1,37 ± 0,16*	0,44 ± 0,08*	4,78 ± 0,26*	7,34 ± 0,19*

Примітка. Тут і в табл. 2: * — ступінь вірогідності різниці досліджуваних показників у риб дослідних груп порівняно до показників у риб контрольної групи.

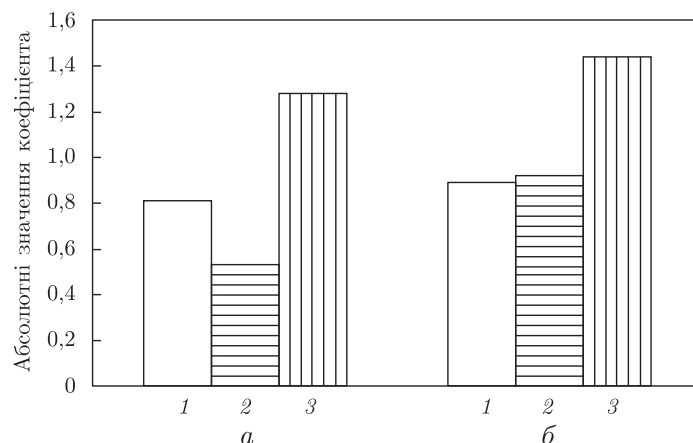


Рис. 1. Показник “коефіцієнта токсичності металу” при дії підвищених концентрацій іонів цинку (а) та кадмію (б): 1 — контроль; 2 — 0,5 ГДК; 3 — 2 ГДК ($M \pm m, n = 5$)

Отже, отримані дані вказують на істотні зміни вмісту фосфоліпідів у ядрах клітин зябер при експозиції підвищених концентрацій іонів цинку та кадмію. Співвідношення фосфоліпідів окремих фракцій змінює проникність ядерної мембрани, що визначає рівень акумулювання металу та відповідно характер його впливу. На основі цих результатів для визначення характеру відповіді на дію іонів у певній концентрації пропонуємо “коефіцієнт токсичності металу”, який розраховується за такою формулою:

$$K_{TM} = \frac{\frac{m_{\text{металу}}^{\text{дослід}} / m_{\text{металу}}^{\text{контроль}}}{m_{\text{ФХ}}^{\text{дослід}} / m_{\text{ФХ}}^{\text{контроль}}}}{\frac{m_{\text{ФЕА}}^{\text{дослід}}}{m_{\text{ФЕА}}^{\text{контроль}}}}$$

При дії іонів цинку та кадмію у допороговій концентрації коефіцієнт токсичності металу знижується (рис. 1), що вказує на адаптаційні перебудови мембран ядер клітин зябер та підтверджується достовірним зниженням вмісту первинних продуктів пероксидації ліпідів. При дії іонів металів у сублетальних концентраціях спостерігаємо зростання K_{TM} , що свідчить про їх токсичний вплив. Опосередкованим підтвердженням цьому є зростання кількості гідропероксидів ліпідів, вміст яких обумовлює розвиток патологічного процесу.

Таким чином, кореляція результатів розрахунку коефіцієнта токсичності металу з показниками нагромадження гідропероксидів ліпідів для іонів цинку становить 98%, для іонів кадмію — 95,4%.

Таблиця 2. Вміст металів та гідропероксидів ліпідів у мембранах ядер клітин зябрового епітелію при дії підвищених концентрацій іонів Zn^{2+} й Cd^{2+} ($M \pm m, n = 5$)

Метал	Кількість токсиканту в середовищі	Кількість акумульованого металу, нг/мг білка	Вміст гідропероксидів ліпідів, Е/г вологої тканини
Zn^{2+}	Контроль	$1012 \pm 67,8$	$2,44 \pm 0,21$
	0,5 ГДК	$886 \pm 52,6^*$	$2,22 \pm 0,35^*$
	2 ГДК	$1355 \pm 84,7^*$	$3,87 \pm 0,32^*$
Cd^{2+}	Контроль	$56,06 \pm 4,83$	$2,125 \pm 0,12$
	0,5 ГДК	$61,7 \pm 7,08$	$2,15 \pm 0,19$
	2 ГДК	$95,23 \pm 5,42^*$	$3,825 \pm 0,23^*$

1. *Krenc E. M.* Липиды клеточных мембран. – Ленинград: Наука, 1981. – 339 с.
2. *Killian J. A., van Meer G.* The “double life” of membrane lipids // *EMBO Reports*. – 2001. – **21**. – P. 91–95.
3. *Беспамятнов Г. П., Кротов Ю. А.* Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. – Ленинград: Химия, 1985. – 304 с.
4. *Хочачка П., Сомеро Дж.* Биохимическая адаптация. – Москва: Мир, 1988. – 568 с.
5. *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. and Biophys.* – 1992. – **151**, No 2. – P. 58–61.
6. *Vaskovsky V. E., Kastetsky E. V., Vasedin I. M.* A universal reagent for phospholipids analysis // *J. Chromatogr.* – 1985. – **114**. – P. 129–141.
7. А.с. 1084681 СССР, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / В. В. Мирончик. – № 3468369/28-13; Заявл. 08.07.82; Опубл. 07.04.84, Бюл. № 13.
8. *Лакун Г. Ф.* Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва: Высш. шк., 1990. – 352 с.
9. *Kodaki T., Yamashita S.* Phosphatidylethanolamine Methylation Pathway // *J. Biol. Chem.* – 1987. – **262**. – P. 15428–15435.
10. *Hagar A. F., Hazel J. R.* Changes in desaturase and the fatty acid composition of microsomal membranes from liver tissue of thermally acclimating rainbow trout // *J. Comp. Physiol.*, 1985. – **156B**, No 1. – P. 35–42.
11. *DeLong C. J., Qin L., Cui Z.* Nuclear localization of enzymatically active green fluorescent protein-CTP: phosphocholine cytidyltransferase alpha fusion protein is independent of cell cycle conditions and cell types // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 32325–32330.
12. *Cumming D. S., Mchowat J., Schnellmann R. G.* Phospholipase A₂ in cell injury and death // *J. Pharm. Experim. Therapeutic.* – 2000. – **294**. – P. 793–799.
13. *Merrill A. H. J., Sweely C. C.* Sphingolipid: metabolism and cell signalling. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* / Ed. D. E. Vance, J. E. Vance. – Amsterdam: Elsevier, 1996. – P. 1–34.
14. *Audubert F., Klapisz E., Berguerand M. et al.* Differential potentiation of arachidonic acid release by rat A₂ adrenergic receptor subtypes // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999. – **1437**. – P. 265–276.

Тернопільський національний педагогічний
університет ім. Володимира Гнатюка

Надійшло до редакції 22.11.2012

Ю. И. Сеник, В. А. Хоменчук, В. З. Курант, В. В. Грубинко

Липидный состав ядер клеток жабр карпа (*Cyprinus carpio* L.) при действии повышенных концентраций ионов цинка и кадмия

Исследованы изменения фосфолипидного состава ядер клеток жабр при экспозиции 0,5, 2 мг/дм³ Zn²⁺ и 0,005, 0,02 мг/дм³ Cd²⁺. Изучено накопление этих металлов и установлена активность ПОЛ при их действии токсикантов. Установлено, что изменения исследуемых показателей зависят не только от количества металла, но и от его физико-химических характеристик. Рассчитан “коэффициент токсичности металла”, что отражает характер воздействия соответствующей концентрации металла.

J. I. Senyk, V. A. Khomenchuk, V. Z. Kurant, V. V. Hrubinko

Lipid composition of cell nuclei of carp gills (*Cyprinus carpio* L.) at the action of high concentrations of zinc and cadmium ions

The changes of the phospholipid composition of cell nuclei of gills are studied. The concentrations of zinc and cadmium ions were 0.5 and 2 mg/dm³ Zn²⁺ and 0.005 and 0.02 mg/dm³ Cd²⁺. The accumulation of these metals in nuclei is studied, and the activity of lipid peroxidation under their action is determined. It is found that changes in the studied parameters depend not only on the amount of a metal, but also on its physical and chemical characteristics. The “coefficient of metal toxicity”, which accurately reflects the nature of the impact of the metal concentration, is calculated.