

# БІОХІМІЯ

УДК 639.215.2 : 612.111 : (546.47+546.48)

doi: 10.25128/2078-2357.21.1-2.4

В. О. ХОМЕНЧУК, Ю. І. СЕНИК, В. З. КУРАНТ

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027  
e-mail: khomenchuk@tnpu.edu.ua

## **ОСОБЛИВОСТІ ТРАНСПОРТУ ЦИНКУ І КАДМІЮ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЇХ ІОНІВ У ВОДІ**

---

Досліджено особливості транспорту Цинку та Кадмію через мембрани еритроцитів коропа *in vitro* після 14 аклімації риб до підвищених концентрацій іонів  $Zn^{2+}$  та  $Cd^{2+}$  у воді. Встановлено, що поглинання цих металів еритроцитами коропа є до певної межі регульованим та концентраційнозалежним процесом. Зростання значення константи Міхаеліса сорбції іонів металів еритроцитами риб аклімованих до дії підвищених концентрацій іонів  $Zn^{2+}$  та  $Cd^{2+}$  вказує на зменшення їх спорідненості до металів, що є адаптивною відповіддю клітин на дію підвищених концентрацій токсикантів. Характер проникнення Цинку та Кадмію через біомембрану червоних кров'яних тілець риб, аклімованих до дії 2 ГДК іонів досліджених металів є очевидно результатом значних порушень цілісності мембрани клітин, і, як наслідок, зменшення здатності регулювати та обмежувати надходження досліджених металів до еритроцитів риб.

*Ключові слова:* транспорт, цинк, кадмій, еритроцити, короп.

Низка металів, входячи до складу живих організмів, є регуляторами багатьох фізіологічних та біохімічних процесів у них, у тому числі і водних тварин. Разом з тим, деякі метали, що потрапляють у гідроекосистеми з природних та антропогенних джерел, є вкрай токсичними для риб [9, 12].

Основною мішенню токсичної дії важких металів є біологічні мембрани [2, 3]. Еритроцити – універсальна модель для вивчення процесів, що відбуваються в клітинній мембрані під дією найрізноманітніших чинників, у тому числі металів [1]. Мембранам еритроцитів, окрім того, притаманні загальні принципи молекулярної організації плазматичних мембран [6]. Тому закономірності змін структури і функції мембрани еритроцитів за впливу іонів металів можуть бути екстрапольовані на інші мембранні системи.

Відомо, що організм риб має здатність адаптуватись до дії іонів металів та регулювати кількість їх надходження. Одним із важливих механізмів лімітування надходження металів є структурна перебудова мембран [10]. Тому нами було досліджено особливості транспорту Цинку та Кадмію через мембрани еритроцитів коропів, адаптованих до підвищених концентрацій іонів  $Zn^{2+}$  та  $Cd^{2+}$ . Дослідження функціональних змін показників мембран еритроцитів риб за дії металів також дозволить повніше дослідити механізми адаптації організму риб до несприятливих еколого-хімічних чинників навколишнього середовища.

### Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus caprio* L.) з середньою масою 300–350 г. Вивчали особливості транспорту Цинку та Кадмію через мембрани еритроцитів риби *in vitro* після 14 денної аклімації риби до підвищених концентрацій іонів  $Zn^{2+}$  та  $Cd^{2+}$  у воді. Період аклімації у риби у токсичних умовах є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-чинника [8].

Риби утримували в акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою (вміст  $O_2$  складав  $7,5 \pm 0,5$  мг/дм<sup>3</sup>;  $CO_2$  –  $2,5 \pm 0,3$  мг/дм<sup>3</sup>; рН –  $7,8 \pm 0,1$ ). Іони металів вносили в концентраціях, що відповідали 0,5 та 2,0 рибогосподарським ГДК ( $0,5$  і  $2$  мг/дм<sup>3</sup> для  $Zn^{2+}$  та  $0,005$  мг/дм<sup>3</sup> і  $0,02$  мг/дм<sup>3</sup> для  $Cd^{2+}$ ) [7]. Необхідні концентрації іонів металів у воді створювали внесенням солей  $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$  та  $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$  кваліфікації “х.ч.”.

Після аклімації риби до токсичних умов *in vitro* вивчали концентраційну залежність проникнення Цинку та Кадмію в еритроцити адаптованих та неадаптованих риби. Кров для дослідження відбирали із серця риби. Голку для взяття крові з метою запобігання коагуляції попередньо обробляли розчином гепарину. Еритроцити крові отримували центрифугуванням охолодженої гепаринізованої крові риби протягом 10 хв при 3000 об./хв [4].

Іони металів ( $0,1$ ,  $0,5$ ,  $1$ ,  $2$ ,  $3$  та  $5$  мг/дм<sup>3</sup>) в інкубаційне середовище вносили у вигляді розчину солей  $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$  та  $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$  кваліфікації “х.ч.”. Як інкубаційне середовище використано розчин Рінгера для холоднокровних ( $NaCl$  –  $129,6$  мМ,  $CaCl_2$  –  $1,8$  мМ,  $NaHCO_3$  –  $2,5$  мМ,  $KCl$  –  $2,7$  мМ). Співвідношення об'єму крові до об'єму середовища інкубації становило 1:10. Час інкубації тривав 30 хв за температури  $18^\circ C$  розчину, що був насичений атмосферним киснем. Реакцію зупиняли додаванням  $0,5$  мл  $0,01$  М розчину ЕДТА, після чого еритроцити промивали тричі чистим фізіологічним розчином. Рівень накопичення Цинку та Кадмію визначали як різницю між вмістом металів в контрольній (без додавання іонів металів) та дослідних групах та виражали в мкг/г вологої маси. Кінетичні параметри накопичення металів у тканинах розраховували графічно за інтенсивністю накопичення та в координатах Лайнуівера-Берка.

Для визначення вмісту кадмію та цинку в еритроцитах останні спалювали в перегнаній нітратній кислоті у співвідношенні 1:5 (маса: об'єм). Вміст металів визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115. Усі одержані дані оброблено статистично з використанням t-критерію Стьюдента [5].

### Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що поглинання іонів Цинку в риби контрольної групи в діапазоні  $0,1$ - $2$  мг/дм<sup>3</sup> іонів металу в середовищі інкубації має місце значне зростання кількості сорбованого металу (від  $1,98$  до  $4,57$  мкг/г), після чого транспорт іонів  $Zn^{2+}$  сповільнюється (рис. 1).

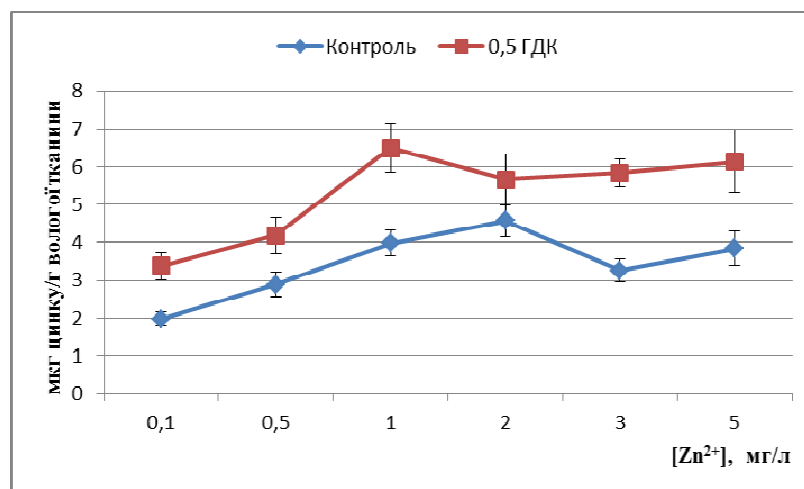


Рис. 1. Вплив адаптації до дії 0,5 ГДК іонів Цинку на його поглинання еритроцитами коропа.

Подібний профіль поглинання іонів Цинку було відмічено в риб, аклімованих до 0,5 ГДК іонів  $Zn^{2+}$ . Проте максимум акумульованого металу відмічено за 1 мг/дм<sup>3</sup> іонів металу в середовищі інкубації еритроцитів риб.

Таку закономірність кінетики поглинання іонів Цинку, імовірно, можна пояснити насиченням поверхні еритроцитів металом, після чого процес накопичення лімітується проникненням металу через мембранні структури. Слід відзначити більші кількості сорбованого Цинку еритроцитами риб, що були аклімовані до 0,5 ГДК іонів  $Zn^{2+}$ . Очевидно, це пояснюється більшою кількістю сайтів зв'язування на поверхні еритроцитарної мембрани.

Було встановлено, що максимальна швидкість надходження  $Zn^{2+}$  через мембрану еритроцитів у неаклімованих коропів становить  $8,93 \cdot 10^{-3}$  мкмоль/г·хв, а значення константи Міхаеліса поглинання для  $Zn^{2+}$  становить  $0,258$  мкмоль<sup>-1</sup> (рис. 2).

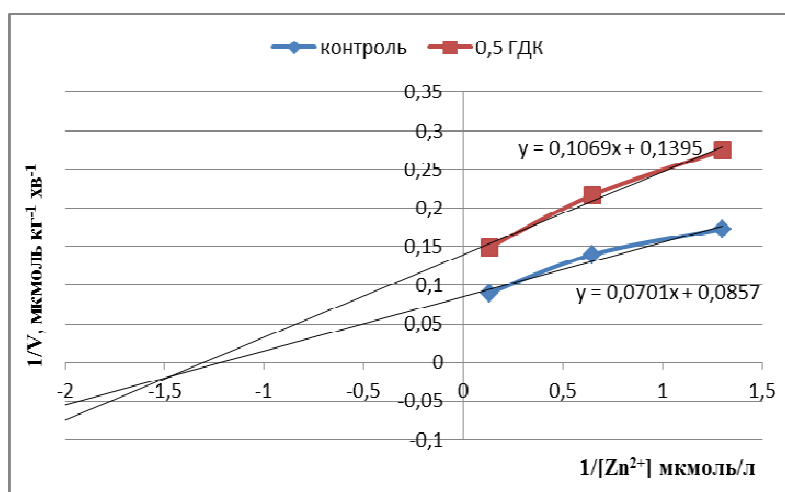


Рис. 2. Поглинання іонів  $Zn^{2+}$  еритроцитами коропа в координатах Лайнуівера-Берка.

Константа Міхаеліса сорбції Цинку еритроцитами риб, аклімованих до дії допорогових концентрацій іонів цинку, становила  $0,262$  мкмоль<sup>-1</sup>, а максимальна швидкість надходження –  $1,05 \cdot 10^{-2}$  мкмоль/г·хв.

Подібність кінетичних кривих накопичення токсиканту, а також незначні зміни в значеннях максимальної швидкості надходження іонів Цинку та константи Міхаеліса в контрольних та аклімованих до дії допорогових концентрацій іонів Цинку груп риб вказує на незначні структурно-функціональні зміни мембрани еритроцитів.

У риб, аклімованих до дії 2 ГДК іонів цинку, характер залежності поглинання  $Zn^{2+}$  еритроцитами відмінний від групи риб, адаптованих до впливу 0,5 ГДК токсиканту. Дослідження показують, що кількість поглинутого металу еритроцитами у цій групі коропів є нижчою порівняно з рибами, адаптованими до дії допорогових концентрацій, хоча кількість поглинутих іонів  $Zn^{2+}$ , у цілому, також була вищою в червоних кров'яних тільцях порівняно з контрольною групою (рис. 3).

Із одержаних даних видно, що проникнення іонів  $Zn^{2+}$  через мембрану еритроцитів аклімованих риб до дії сублетальної кількості Цинку в інтервалі концентрацій іонів металу 0,1 – 1 мг/дм<sup>3</sup> має лінійний характер. За концентрації  $Zn^{2+}$  близько 1 мг/л відмічається насичення мембрани еритроцитів з подальшим зменшенням кількості поглинутого металу при концентрації 2 мг/дм<sup>3</sup>. В інтервалі концентрацій 2–5 мг/дм<sup>3</sup> іонів Цинку в середовищі інкубації спостерігається лінійне зростання кількості сорбованого металу еритроцитами, що, очевидно, свідчить про нерегульоване надходження металу за градієнтом концентрації.

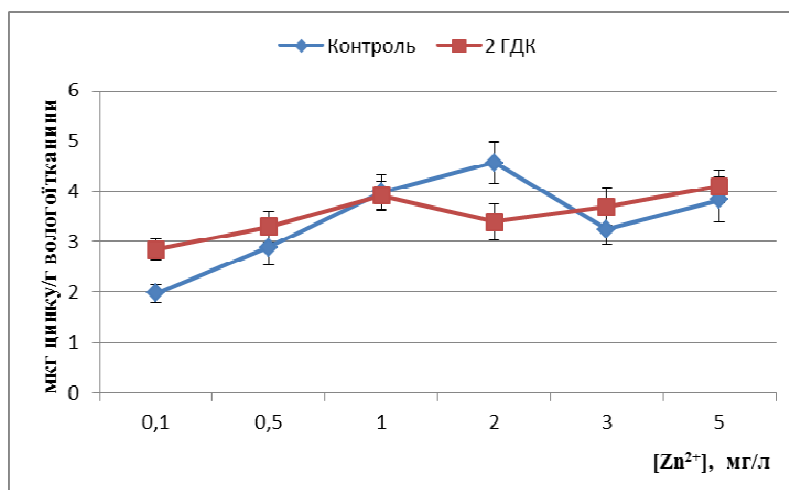


Рис. 3. Вплив адаптації до дії 2 ГДК іонів Цинку на його поглинання еритроцитами коропа.

Зменшення кількості накопиченого металу в еритроцитах аклімованих риб до дії 2 ГДК токсиканту порівняно з показниками еритроцитів аклімованих риб до дії допорогової концентрації, очевидно, є наслідком адаптивних змін мембрани еритроцитів з метою обмеження надходження цинку до клітин крові коропа. Було встановлено, що константа Міхаеліса поглинання Цинку еритроцитами риб, аклімованих до дії 2 ГДК іонів Цинку, становить  $0,775 \text{ мкмоль}^{-1}$ , а максимальна швидкість транспорту іонів металу –  $1,68 \cdot 10^{-2} \text{ мкмоль/г} \cdot \text{хв}$  (рис. 4).

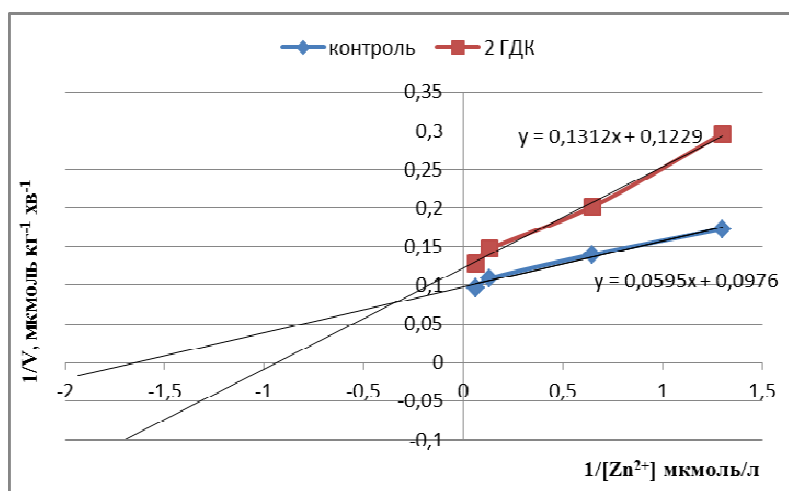


Рис. 4. Поглинання іонів  $\text{Zn}^{2+}$  еритроцитами коропа в координатах Лайнуївера-Берка.

Отримані дані щодо накопичення іонів Кадмію в еритроцитах дослідних коропів показують, що адаптовані до дії допорогових концентрацій токсиканта риби сорбують більшу його кількість порівняно з контрольною групою (рис. 5).

При зростанні кількості іонів  $\text{Cd}^{2+}$  у середовищі інкубації  $> 2 \text{ мг/л}$  спостерігається сповільнення процесу поглинання металу еритроцитами риб дослідної групи. Це можна пояснити, з одного боку, інгібуванням мембранних переносників, можливо, за рахунок зв'язування металу з їх  $-\text{SH}$  групами, адже відомо, що Кадмій відноситься до групи так званих «тіолових отрут» [11], а з іншого – зростанням резистентності мембранних структур та ізолюючої здатності мембрани щодо іонів  $\text{Cd}^{2+}$ .

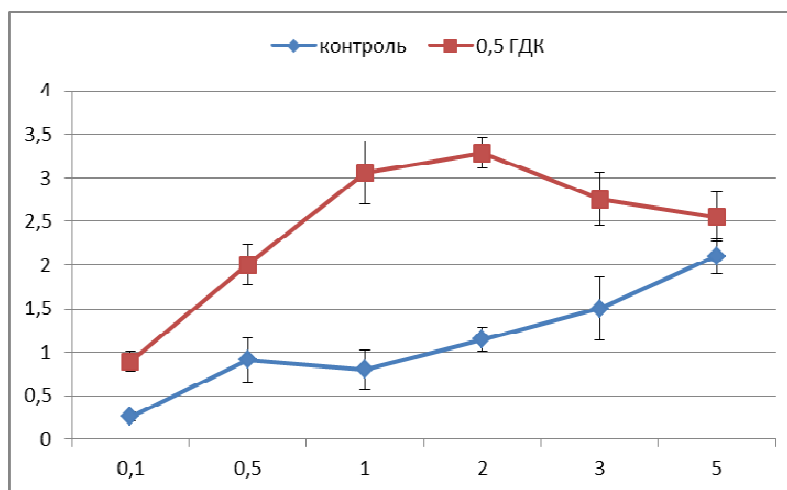


Рис. 5. Вплив адаптації до дії 0,5 ГДК Кадмію на його поглинання еритроцитами коропа.

Було встановлено, що константа Міхаеліса для процесів сорбції та проникнення через мембрану еритроцитів риб, аклімованих до дії допорогових концентрацій іонів Кадмію, розрахована графічно за методом подвійних зворотних величин, становлять  $2,46 \cdot 10^{-2}$  мкмоль<sup>-1</sup>, а максимальна швидкість процесу –  $0,00258$  мкмоль/г·хв (рис. 6).

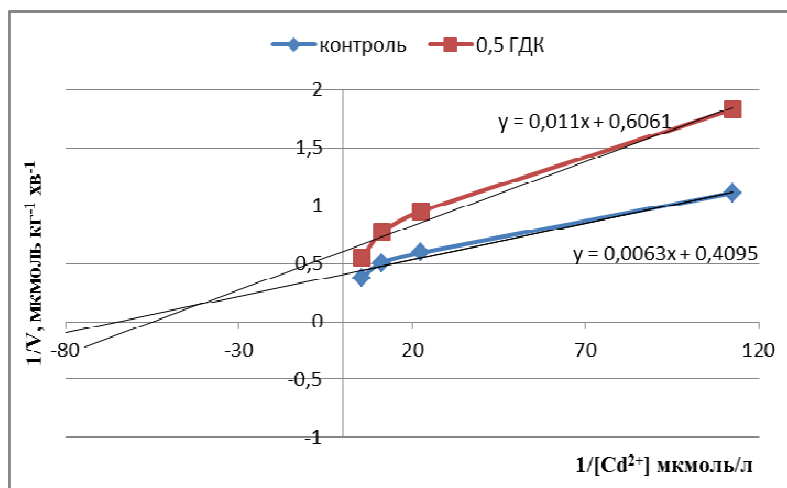


Рис. 6. Поглинання іонів Cd<sup>2+</sup> еритроцитами коропа в координатах Лайнуівера-Берка.

Максимальна швидкість надходження Cd<sup>2+</sup> через мембрану еритроцитів у неадаптованих риб становила  $1,62 \cdot 10^{-3}$  мкмоль/г хв, а константа Міхаеліса –  $1,2 \cdot 10^{-2}$  мкмоль<sup>-1</sup>.

Порівнюючи дані поглинання Кадмію еритроцитами адаптованих риб з контрольною групою, можна відзначити збільшення значення константи Міхаеліса, що вказує на зниження спорідненості мембранних переносників до іонів Кадмію, а також зростання швидкості їх транспорту через мембрану еритроцитів. Одержані результати можуть свідчити про синтез специфічних ізоформ мембранних переносників, що є адаптивною відповіддю на дію підвищених концентрацій токсиканта у воді. Очевидно, такі функціональні зміни транспортних білків мембрани сприяють інтенсифікації процесів перерозподілу та виведення Кадмію з організму риб.

У риб, адаптованих до дії 2 ГДК іонів Cd<sup>2+</sup>, характер залежності поглинання Cd<sup>2+</sup> еритроцитами відмінний від групи риб, аклімованих до 0,5 ГДК металу (рис. 7).

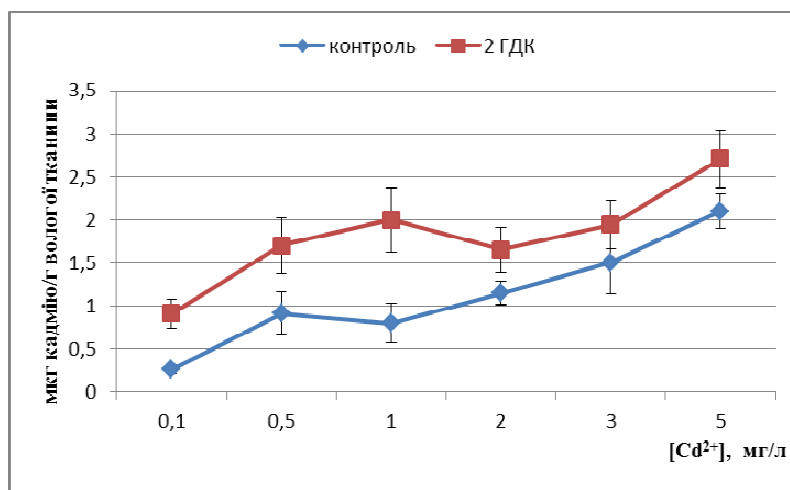


Рис. 7. Вплив адаптації до дії 2 ГДК Кадмію на його поглинання еритроцитами коропа.

Відмічено послаблення поглинання іонів металу при концентрації його 2 мг/дм<sup>3</sup> в середовищі інкубації з подальшим лінійним зростанням без ефекту насичення.

Було встановлено, що константа Міхаеліса сорбції Кадмію мембраною еритроцитів риби, аклімованих до дії 2 ГДК іонів Кадмію, становила  $4,7 \cdot 10^{-2}$  мкмоль<sup>-1</sup>, а максимальна швидкість транспорту іонів металу –  $3,17 \cdot 10^{-3}$  мкмоль/г хв (рис. 8).

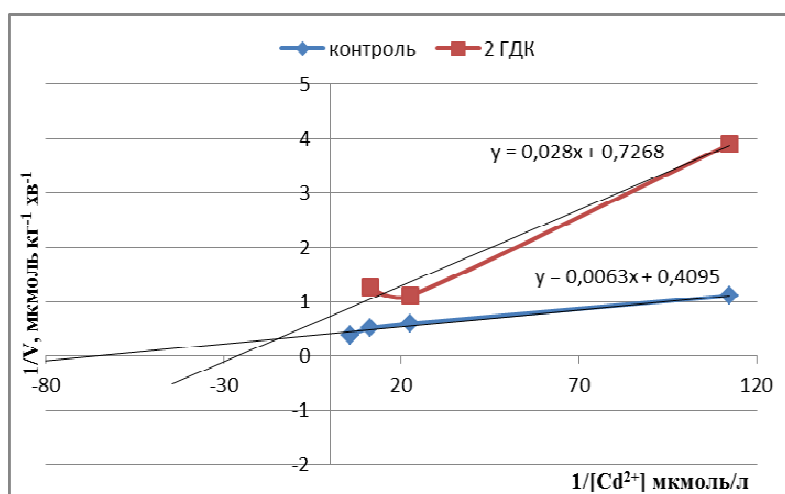


Рис. 8. Поглинання іонів Cd<sup>2+</sup> еритроцитами коропа в координатах Лайнуівера-Берка.

Очевидно, при зростанні концентрації токсиканту вище 2 мг/л мембранні структури неефективно обмежують надходження іонів Cd<sup>2+</sup> та має місце пряма залежність між концентрацією токсиканту у воді та його кількістю в еритроцитах.

**Висновки**

Поглинання іонів Цинку та Кадмію еритроцитами коропа є до певної межі регульованим та концентраційнозалежним процесом. 14-денна адаптація риби до підвищених концентрацій іонів Zn<sup>2+</sup> та Cd<sup>2+</sup> призводить до суттєвих змін у проникності біологічної мембрани еритроцитів. Зростання значення константи Міхаеліса сорбції іонів металів еритроцитами риби, аклімованих до дії підвищених концентрацій іонів Zn<sup>2+</sup> та Cd<sup>2+</sup>, указує на зменшення їх спорідненості до металів, що є адаптивною відповіддю клітин на дію підвищених концентрацій токсикантів. Характер проникнення Цинку та Кадмію через біомембрану червоних кров'яних тілець риби, аклімованих до дії 2 ГДК іонів Zn<sup>2+</sup> та Cd<sup>2+</sup>, є, очевидно, результатом значних порушень

цілісності мембрани клітин, і, як наслідок, зменшення здатності регулювати та обмежувати надходження досліджених металів до еритроцитів риб.

1. Абдуллаева Н. М., Габибов М. М. Состояние мембран эритроцитов периферической крови рыб при воздействии тяжелых металлов и сырой нефти. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2011. № 5. С. 50–54.
2. Апихтіна О. Л. Дослідження мембранотоксичної дії важких металів на моделі еритроцитів крові in vitro. *Сучасні проблеми токсикології*. 2011. № 1–2. С. 65–69.
3. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функция. М. : Мир, 1997. 624 с.
4. Житенёва Л. Д., Рудницкая О. А., Каложная Т. И. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник. Ростов на Дону : АЗНИИРХ, 1997. 149 с.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия : учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-е. изд., перераб. и доп. М. : Высш. шк., 1990. 352 с.
6. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степовая Е. А., Федорова Т. С., Кравец Е. Б., Иванов В. В., Жаворонок Т. В., Часовских Н. Ю., Чудакова О. М., Бутусова В. Н., Яковлева Н. М. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы. *Бюллетень сибирской медицины*, 2006. № 2. С. 62–69.
7. Обобщенный перечень предельно-допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно-безопасных уровней воздействия вредных веществ (ОБУВ) для воды рыбохозяйственных водоемов / Минрыбхоз СССР. М., 1990. 44 с.
8. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М. : Мир, 1988. 568 с.
9. Hemmadi V. A critical review on integrating multiple fish biomarkers as indicator of heavy metals contamination in aquatic ecosystem. *International Journal of Bioassays*. 2017. Vol. 6 (9). P. 5494–5506.
10. Henderson R. J., Tocher D. R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, 1987. Vol. 26 (4). P. 281–347.
11. Remelli M., Nurchi V. M., Lachowicz J. I., Medici S., Zoroddu M. A., Peana M. Competition between Cd (II) and other divalent transition metal ions during complex formation with amino acids, peptides, and chelating agents. *Coord. Chem. Rev.* 2016. Vol. 327–328. P. 55–69.
12. Wood Chris M., Farrell Anthony P., Brauner Colin J. Homeostasis and toxicology of essential metals edited. *Fish Physiology*. London : Academic Press. 2011. Vol. 31. Part A. P. 1–497.

## References

1. Abdullaeva N. M., Gabibov M. M. Sostoyanie membran eritrocitov perifericheskoy krovi ryb pri vozdeystvii tyazhelyh metallov i syroj nefiti. *Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskij region. Estestvennye nauki*. 2011. № 5. С. 50–54. [in Russian]
2. Апыхтіна О. Л. Дослідження мембранотоксичної дії важких металів на моделі еритроцитів крові in vitro. *Suchasni problemy toksykologii*. 2011. № 1–2. С. 65–69. [in Ukrainian]
3. Gennis R. Biomembrany: Molekulyarnaya struktura i funkciya. М. : Mir, 1997. 624 s. [in Russian]
4. Zhitenyova L. D., Rudnickaya O. A., Kalyuzhnaya T. I. Ekologo-gematologicheskie harakteristiki nekotoryh vidov ryb. *Spravochnik*. Rostov na Donu : AzNIIRH, 1997. 149 s. [in Russian]
5. Lakin G. F. Biometriya : Uchebnoe posobie dlya biol. spec. vuzov. 4-e. izd., pererab. i dop. М. : Vyssh. shk., 1990. 352 s. [in Russian]
6. Novickij V. V., Ryazanceva N. V., Stepovaya E. A., Fedorova T. S., Kravec E. B., Ivanov V. V., Zhavoronok T. V., Chasovskih N.Yu., Chudakova O. M., Butusova V. N., Yakovleva N. M. Molekulyarnye narusheniya membrany eritrocitov pri patologii raznogo geneza yavlyayutsya tipovoj reakciej organizma: kontury problemy. *Byulleten sibirskoj mediciny*, 2006. № 2. S. 62–69. [in Russian]
7. Obobshchennyj perechen predelno-dopustimyh koncentracij (PDK) i orientirovochno-bezopasnyh urovnej vozdeystviya vrednyh veshchestv (OBUV) dlya vody rybohozyajstvennyh vodoemov / Minrybhoz SSSR. М., 1990. 44 s. [in Russian]
8. Hochachka P., Somero Dzh. Biohimicheskaya adaptaciya. М.: Mir, 1988. 568 s. [in Russian]
9. Hemmadi V. A critical review on integrating multiple fish biomarkers as indicator of heavy metals contamination in aquatic ecosystem. *International Journal of Bioassays*. 2017. Vol. 6 (9). P. 5494–5506.
10. Henderson R. J., Tocher D. R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, 1987. Vol. 26 (4). P. 281–347.
11. Remelli M., Nurchi V.M., Lachowicz J.I., Medici S., Zoroddu M.A., Peana M. Competition between Cd (II) and other divalent transition metal ions during complex formation with amino acids, peptides, and chelating agents. *Coord. Chem. Rev.* 2016. Vol. 327–328. P. 55–69.

12. Wood Chris M., Farrell Anthony P., Brauner Colin J. Homeostasis and toxicology of essential metals edited. Fish Physiology. London : Academic Press. 2011. Vol. 31. Part A. P. 1–497.

*V. O. Khomnechuk, Yu. I. Senyk, V. Z. Kurant*

Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine

PECULIARITIES OF ZINC AND CADMIUM TRANSPORT THROUGH ERYTHROCYTIC MEMBRANES UNDER THE ACTION OF INCREASED CONCENTRATIONS OF THEIR IONS IN WATER

The peculiarities of Zinc and Cadmium transport through carp erythrocyte membranes in vitro after 14 acclimatization of fish to elevated concentrations of  $Zn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  ions were studied. It has been established, that the uptake of Zinc and Cadmium by carp erythrocytes is to a certain extent a regulated and concentration-dependent process. The uptake of Zinc and Cadmium has been shown to involve two stages: rapid sorption of metals by the membrane surface of fish erythrocytes and slower penetration through the apical membrane of red blood cells. The increase in the value of the Michaelis constant of sorption of metal ions by erythrocytes of fish acclimatized to elevated concentrations of  $Zn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  ions indicates a decrease in their affinity for metals, which is the adaptive response of cells to elevated concentrations of toxicants. The nature of the penetration of Zinc and Cadmium through the biological membrane of red blood cells of fish acclimatized to the action of 2 MPC of  $Zn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  ions is obviously the result of significant violations of cell membrane integrity, and, consequently, reduced ability to regulate and limit the flow of studied metals .

*Keywords: transport, zinc, cadmium, erythrocytes, carp.*

Надійшла 06.05.2021.