

1. *Беленічев І. Ф.* Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І. Ф. Беленічев, С. Л. Левицький, Ю. І. Губський // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 3. – С. 24–29
2. *Гонський Я. І.* Біохімія людини / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – С. 515–527.
3. *Губський Ю.И.* Коррекция химического поражения печени / Ю.И. Губский. – К.: Здоров'я, 1989. – 168 с.
4. *Колб В. Г.* Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 311 с.
5. *Колесова О. Е.* Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лаб. дело. – 1984. – № 9. – С. 540–546.
6. *Королюк М. А.* Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И.Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
7. *Тэфтюева Н. Б.* Перекисне окиснення ліпідів та стан антиоксидної системи крові щурів за умов токсичного гепатиту та дії настоянки перстачу прямостоячого. / Н. Б. Тэфтюева, І. Ф. Мещишен //Медична хімія. – 2003. – № 4. – С. 75–79
8. *Стальная И. Д., Гаршивили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
9. *Чевари С.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
10. *Beachamp C.* Superoxide dismutase: improved assay and assay a plicable to acrilamide gells./ С. Beachamp, J. Fridovich // Analyt. Biochem. – 1974. –Vol. 44, № 7. – P. 276–279.

Рекомендує до друку
В.В. Грубінко

Надійшла 20.01.2012

УДК 547.915: 639.215.2

Ю.І. СЕНИК, Ю.М. ПОТЕРБА, Б.З. ЛЯВРІН, В.О. ХОМЕНЧУК, В.З. КУРАНТ

Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

РОЛЬ ФОСФОЛІПІДІВ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ КОРОПА У ФОРМУВАННІ ТОКСИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ КАДМІЮ

Досліджено ліпідний склад мембран еритроцитів коропа за дії підвищених концентрацій іонів кадмію. Встановлено, що дія як допорогової, так і сублетальної концентрацій токсиканта викликала зростання кількості фосфатидилетаноламіну, лізофосфатидилхоліну, сфінгомієліну і фосфатидилінозиту та зменшення кількості фосфатидилхоліну і фосфатидилсерину, проте більш вираженими дані зміни були у випадку дії 2 гранично допустимих концентрацій іонів Cd²⁺. Отримані результати вказують на перерозподіл фракцій фосфоліпідів на зовнішній стороні біомембрани, а зміни кількості холін-вмісних ліпідів та фосфатидилінозиту сприяють зростанню в'язкості біліпідного шару еритроцитів, що забезпечує обмеження надходження іонів кадмію в клітину.

Ключові слова: короп, еритроцити, фосфоліпіди, кадмій

Останнім часом важкі метали займають ключову роль у забрудненні водних екосистем, що обумовлено, перш за все, їхньою стійкістю в середовищі та включенням в колообіг речовин [2].

Функціонально низка металів, входячи до складу живого, є регуляторами багатьох фізіологічних та біохімічних процесів, а тому відіграють важливу роль у життєдіяльності всіх організмів, у тому числі і водних тварин [9]. Разом з тим, деякі метали, що потрапляють у

гідроекосистеми з природних та антропогенних джерел є вкрай токсичними для гідробіонтів. Проте представники обох груп металів володіють вираженою шкодочинністю в дозах, що перевищують оптимальні [4].

Відомо [10], що організм має здатність адаптуватись до дії іонів металів та регулювати кількість їх надходження. Одним із важливих механізмів лімітування надходження металів є структурна перебудова мембран [17, 18]. Саме тому нами було досліджено ліпідний склад мембран еритроцитів коропа за дії іонів кадмію.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus caprio* L.), масою 250 – 300 г., яких утримували в акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою, яку змінювали щодобово, за наступних умов: вміст O_2 – $7,5 \pm 0,5$ мг/л; CO_2 – $2,5 \pm 0,3$ мг/л; рН – $7,8 \pm 0,1$. У кожному акваріумі утримувалось по 5 риб. Риб під час аклімації не годували.

Досліджували вплив 0,5 та 2 рибогосподарських граничнодопустимих концентрації (ГДК) іонів кадмію, що становить 0,005 мг/л та 0,02 мг/л Cd^{2+} відповідно. Необхідну концентрацію іонів кадмію у воді створювали розчиненням солі $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ кваліфікації “х.ч.” [1]. Період аклімації риб становив 14 днів, що є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-фактору [10].

Для біохімічного дослідження вмісту ліпідів та їх окремих класів були використані мембрани еритроцитів. «Тіні» еритроцитів одержували шляхом осмотичного гемолізу в 0,01 М розчині хлориду натрію при температурі 4°C. Співвідношення суспензії еритроцитів і гіпотонічного розчину становило 1:50. Мембранні препарати виділяли центрифугуванням протягом 10 хв при 3000 об/хв та тричі відмивали розчином Рінгера для холоднокровних з подальшим відокремленням супернатанту [24]. Для екстрагування загальних ліпідів до одержаних мембран додавали хлороформ-метанолу суміш у відношенні 2:1 за методом Фолча [19]. Неліпідні домішки з екстракту видаляли відмиванням 1% розчином KCl [10]. Кількість загальних ліпідів у мембранах еритроцитів визначали ваговим методом після відгонки екстрагуючої суміші [5].

Розділення ліпідів на окремі фракції проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії в герметичних камерах на пластинках “Silufol UV-254” [6]. Отриманий хлороформний розчин проби ліпідів спочатку випарювали досуха, а потім розчиняли у 1 мл хлороформу. Одержані проби ліпідів наносили на пластинку мікродозатором в кількості 25 мкл розчину. Рухомою фазою для розділення фосfolіпідів була суміш хлороформ-метанол-льодяна оцтова кислота-дистильована вода у співвідношенні 60:30:7:3. Для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти і очищені стандарти [5].

Кількість фосfolіпідів визначали за методом Васьковського [24]. Мінералізацію фосfolіпідів проводили при температурі 180°C, при додаванні концентрованої хлорної кислоти. Кількість неорганічного фосфору визначали спектрофотометрично [8].

Всі одержані дані оброблено статистично з використанням t-критерію Стьюдента [7].

Результати досліджень та їх обговорення

Дія підвищених концентрацій іонів кадмію призводить до значних змін у вмісті загальних ліпідів мембран еритроцитів риб. За дії 0,5 ГДК Cd^{2+} вірогідних змін щодо загального вмісту ліпідів у мембранах еритроцитів не відмічалось, тоді як за дії 2 ГДК мало місце зниження цього показника у 1,82 раза ($p < 0,05$).

З метою вивчення фізіологічного значення окремих класів фосfolіпідів у адаптації еритроцитів коропа до дії підвищених концентрацій токсиканту, було проаналізовано їх кількісне співвідношення (рис. 1).

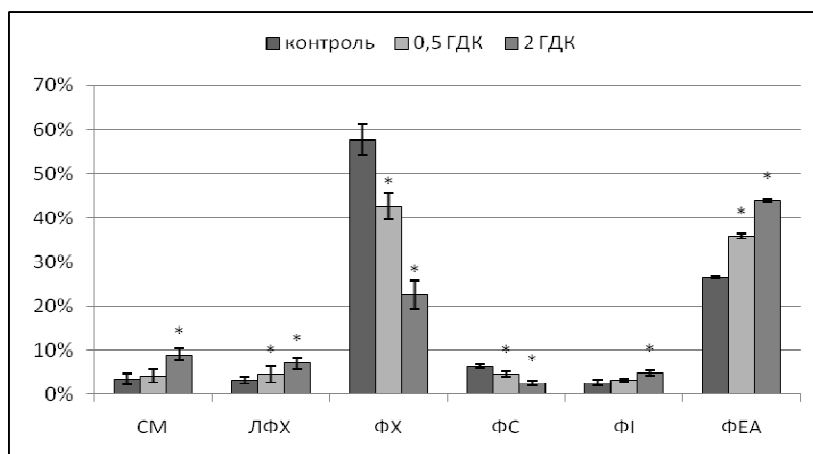


Рис. 1. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в мембранах еритроцитів коропа за дії іонів кадмію ($M \pm m$, $n = 5$)

Примітки: * - тут і на решті рисунків відхилення показників у риб дослідних груп щодо контролю вірогідні ($p < 0,05$); СМ – сфінгомелін, ЛФХ – лізофосфатидилхолін, ФХ – фосфатидилхолін, ФС – фосфатидилсерин, ФІ – фосфатидилінозитол, ФЕА – фосфатидилетаноламін.

При дії 0,5 ГДК та 2 ГДК іонів кадмію, нами виявлені достовірні зміни у вмісті фосфатидилхоліну, кількісно найбільш представленого фосфоліпиду біліпідного шару еритроцитів [16].

Встановлено концентраційнозалежне зниження вмісту ФХ, відповідно, у 1,36 та 2,55 рази ($p < 0,05$). Зниження вмісту фосфотидилхоліну у фосфоліпідній фракції мембран еритроцитів можна пов'язати із його деградацією, внаслідок підвищення активності лізосомальної фосфоліпази A_2 , яка присутня у плазмі тварин [11]. Дану думку підтверджує достовірне накопичення лізофосфатидилхоліну, кількість якого зростає, відповідно, у 1,4 і 2,18 рази та вільних жирних кислот [15, 20].

Зростання вмісту ФЕА за дії 0,5 та 2 ГДК іонів кадмію, відповідно, у 1,35 та 1,66 рази ($p < 0,05$), з паралельним зниженням кількості ФХ, очевидно, є наслідком інгібування іонами металу метилтрансфераз, зменшуючи, тим самим, продуктивність реакції синтезу фосфатидилхоліну з фосфатидилетаноламіну [3]. Достовірне зменшення вмісту ФС за дії допорогової та сублетальної концентрацій токсиканту, відповідно, у 1,36 та 2,54 рази вказує на активацію іонами Cd^{2+} шляху перетворення фосфатидилсерину у фосфатидилетаноламін.

Відмічено відносне зростання вмісту СМ у 1,18 та 2,56 рази ($p < 0,05$), при цьому кількість ліпідів даної фракції у складі мембрани за впливу допорогової та сублетальної концентрацій токсиканту не змінюється, що вказує на перерозподіл ліпідів зовнішнього шару біомембрани еритроцитів [14].

Подібна картина змін спостерігається і для фосфатидилінозитолу. Так, за впливу 0,5 ГДК іонів кадмію відмічено зростання кількості даної фракції у 1,22 рази відносно контролю, тоді як кількість даної фракції дорівнює контрольним показникам. За дії 2 ГДК іонів металу відносний вміст даної фракції зростав у 1,83 рази, тоді як кількість фосфатидилінозитолу знизилася у 1,5 рази. Одержані результати, очевидно, можна пояснити зростанням активності фосфоліпази A_2 , адже відомо, що ФІ є неспецифічним субстратом цього ферменту [22]. Зниження вмісту ФІ у мембрані еритроцитів аклімованих до дії 2 ГДК іонів кадмію риб можна розглядати як компенсаторну реакцію на зростання кількості токсиканту у середовищі, адже відомо, що іони Cd^{2+} взаємодіють з Ca^{2+} -рецепторами фосфатидилінозитидної сигнальної системи [25], внаслідок чого відкриваються Ca^{2+} -канали і іони металів надходять в клітину.

Для підтвердження вище наведених міркувань та інтерпретації змін фосфоліпідного спектру були розраховані коефіцієнти відношення фракцій фосфоліпідів, що мають важливе діагностичне значення для структурно-функціонального стану біомембран (рис. 2).

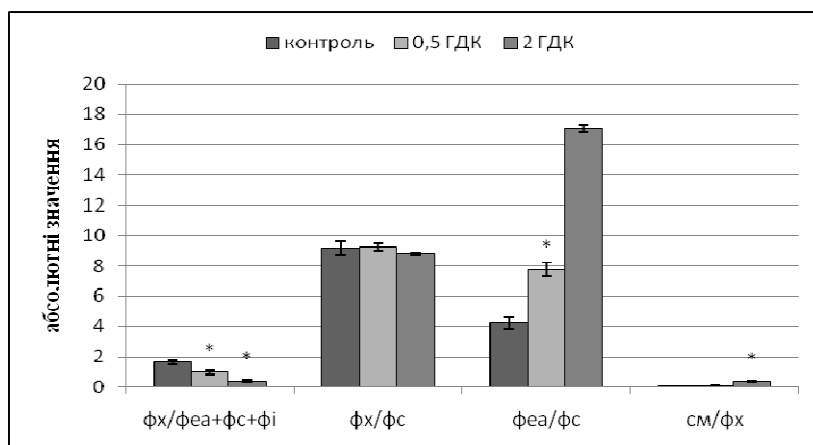


Рис. 2. Вплив іонів кадмію на співвідношення різних фракцій фосфоліпідів в еритроцитах аклімованих риб ($M \pm m$, $n = 5$)

Коефіцієнт ФХ/(ФЕА+ФІ+ФС) зменшується в 1,67 раза за дії 0,5 ГДК токсиканту та у 3,69 раза за впливу 2 ГДК Cd^{2+} . Подібна асиметрія розміщення фосфоліпідів сприяє збільшенню мікрів'язкості мембран [13]. За дії підвищених концентрацій іонів кадмію спостерігається значне зростання співвідношення ФЕА/ФС у 1,85 раза ($p < 0,05$) та у 4,06 раза, відповідно, за дії 0,5 і 2 ГДК токсиканта. Дане співвідношення показує інтенсивність синтезу ФЕА з його попередника – ФС. Одержані результати є опосередкованим показником зміни текучості мембрани у дослідних риб [26]. Зміни показника ФХ/ФС за дії підвищених концентрацій Cd^{2+} практично не відрізняються від контрольних значень, що вказує на перетворення фосфатидилсерину переважно у фосфатидилетаноламін. Зростання співвідношення СМ/ФХ не є результатом перетворення фосфатилхоліну у сфінгомієлін, так як кількісний вміст СМ у мембранах еритроцитів обох дослідних груп риб не змінюється щодо контролю, а, очевидно, є наслідком деградації ФХ.

Висновки

1. Дія 0,5 та 2 ГДК іонів кадмію призводила до подібних змін фракційного складу фосфоліпідів мембран еритроцитів коропа, але за впливу сублетальної концентрації металу ефект був більш вираженим.
2. Встановлено, що дія обох досліджуваних концентрацій токсиканта викликала зростання кількості фосфатидилетаноламіну, лізофосфатидилхоліну, сфінгомієліну і фосфатидилінозитулу та зменшення кількості фосфатидилхоліну і фосфатидилсерину.
3. Одержані результати вказують на перерозподіл фракцій фосфоліпідів на зовнішній стороні біомембрани, а зміни кількості холін-вмісних ліпідів та фосфатидилінозитулу сприяють зростанню в'язкості біліпідного шару еритроцитів, що забезпечує обмеження надходження іонів кадмію в клітину.

1. *Беспамятнов Г.П.* Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник / Г.П. Беспамятнов, Ю.А. Кротов. – Л.: Химия, 1985. – 304 с.
2. *Будников Г.К.* Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных экосистем / Г.К. Будников // Соровский образовательный журнал – 1998. - №5 – С. 23–29.
3. *Васьковский В.Е.* Липиды / В.Е. Васьковский //Соровский образовательный журн. – 1997. – № 3. – С. 32.
4. *Гандзюра В.П.* Концепція шкодо чинності в екології / В.П. Гандзюра, В.В. Грубінко – Київ–Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. Володимира Гнатюка, 2008. – 144с.
5. *Кейтс М.* Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
6. *Копытов Ю.П.* Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов / Ю.П. Копытов // Экология моря. – 1983. – Вып. 12. – С.76–80.
7. *Лакин Г.Ф.* Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-е. изд., перераб. и доп. / Г.Ф. Лакин – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
8. *Стефаник М.Б.* Тонкослойная и газожидкостная хроматография липидов / М.Б. Стефаник, В.И. Скороход, О.П. Елисеева – Львов, 1985. – 27 с.

9. *Финагина О.Л.* Холестерин и биологические мембраны /О.Л. Финагина, Н.В. Печенова. — М.: Мир, 1991. — 134 с.
10. *Хлебович В. В.* Акклимация животных организмов /В. В. Хлебович. - Л.: Наука, 1981.—135с.
11. *Abe A.* The measurement of lysosomal phospholipase A₂ activity in plasma /A. Abe, R. Kelly, J.A. Shaymana// Journal of Lipid Research – 2010.– Vol. 51. – P. 2464–2470.
12. *Asymmetric* distribution of phospho-inositides and phosphatidic acid in the human erythrocyte membrane / [P. Gascard, D. Tran, M. Sauvage et all]// Biochimica et Biophysics Acta. – 1991. – Vol. 1069 – P. 27–36.
13. *Baranska J.* Biosynthesis and transport of phosphatidylserine in the cell /J. Baranska// Adv. Lipids Rev. — 1988. — Vol. 19, № 1 — P. 163–184.
14. *Devi B.* Changes in total lipids in the osmoregulatory organs of the fresh concentrations of mercury /B. Devi, K. Radhakrishnaiah// Z. Aggew. Zool. — 1990. — Vol. 77, № 1. — P. 121–126.
15. *Exton J.H.* Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction /J.H. Exton// Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – Vol. 1212, № 1. – P. 26 – 42.
16. *Filho* changes in the lipid composition of erythrocytes during prolonged fasting in lizard (*Tropidurus Torquatos*) and rat (*Rattus Norvegicus*) /[V.L.M. Lima, M.P.T. Gillett, M.N. Silva et al.] // Comp. Biochem. Physiol. – 1986. – Vol. 83B, № 3, P. 691–695.
17. *Henderson R. J.* The lipid composition and biochemistry of dreshwater fish /R.J. Henderson, D.R. Tocher// Prog. Lipid Res, 1997. — P. 281–347.
18. *Hogstrand C.* Ca²⁺ versus Zn²⁺ transport in the gills of freshwater rainbow trout and the cost of adaptation to waterborne Zn²⁺ /C. Hogstrand, S.D. Reid, C.M. Wood// J. Exp. Biol. – 1995. – Vol. 198. –P. 337–348.
19. *Hokin L.E.* Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase IX. On the role of phospholipids in the enzyme /L.E. Hokin, T.D. Hexum//Arch. Biochem and Biophys. – 1992 – Vol.151, № 2 – P. 58–61.
20. *Mahadevappa V.G.* The molecular species composition of individual diacyl phospholipids in human platelets /V.G. Mahadevappa, B.J. Holub// Biochim Biophys Acta. – 1982. – Vol. 713 – P. 73–79.
21. *Mukherjee A.B.* Phospholipase A₂ enzymes. Regulation and physiological role /A.B. Mukherjee, L. Miele, N. Pattabiraman// Bioch.pharmacology. – 1994. – Vol. 48, №1. – P. 1–10.
22. *Nemeth E.F.* Ca²⁺-receptor-dependent regulation of cellular function /E.F. Nemeth// News in physiological sciences. – 1995. – Vol. 10, № 2. – P. 1–5.
23. *Spiegel S.* Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. /S. Spiegel, A.H. Merrill// FASEB J. – 1996 – Vol. 10 – P. 1388–1397.
24. *Vaskovsky V.E.* A universal reagent for phospholipids analysis /V.E. Vaskovsky, E.V. Kastetsky, I.M. Vasedin// J. Chromatogr. – 1985. – Vol. 114. – P. 129–141.
25. *Whittam R.* Aspects of adenosine-triphosphatase activity in erythrocyte membranes / R. Whittam, M. Ager // Biochem. J. – 1964. – Vol. 93. – P. 337–348.
26. *Wodtke E.* Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperatures phospholipid composition, fatty acid pattern, and cholesterol content / E. Wodtke // Biochimica et Biophysics Acta. – 1978. – Vol. 529 – P. 280–291.

Ю.И. Сенник, Ю.М. Потерба, Б.З. Ляврин, В.О. Хоменчук, В.З. Курант

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, Украина

РОЛЬ ФОСФОЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КАРПА В РАЗВИТИИ ТОКСИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ К ДЕЙСТВИЮ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КАДМИЯ

Исследовано липидный состав мембран эритроцитов карпа при действии повышенных концентраций ионов кадмия. Установлено, что действие как допороговой, так и сублетальной концентраций токсиканта вызывало рост количества фосфатидилэтаноламина, лизофосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидилинозитола и уменьшение количества фосфатидилхолина и фосфатидилсерина. Более выражены изменения были отмечены в случае действия 2 предельно допустимых концентраций ионов Cd²⁺. Полученные результаты указывают на перераспределение фракций фосфолипидов на внешней стороне биомембраны, а изменения количества холин-содержащих липидов и фосфатидилинозитола способствуют росту вязкости билипидного слоя эритроцитов, что уменьшает поступление ионов кадмия в клетку.

Ключевые слова: карп, эритроциты, фосфолипиды, кадмий

J.I. Senyk, J.M. Poterba, B.Z. Lyavrin, V.A. Khomenchuk, V.Z. Kurant

Ternopil Volodimir Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine

THE ROLE OF RED CELL MEMBRANE PHOSPHOTIDE OF CARP IN FORMING OF TOXIC TOLERANCE UNDER INCREASED CADMIUM CONCENTRATIONS

The composition of red cell membrane lipids of carp exposure to 0,5 and 2 fishery maximum allowable concentration (FMAC) of cadmium ions was investigated. That was found the effect of both subthreshold and sublethal concentrations of toxicants caused a growing number of phosphatidylethanolamine, lysophosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylinositol and the reduction of phosphatidylcholine and phosphatidylserine but more pronounced these changes were in the case of two FMAC of cadmium ions. It was noted on the influence of cadmium ions exposure increase the ratio of sphingomyelin/phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine / phosphatidylserine and reduction ratio phosphatidylcholine / phosphatidylethanolamine + phosphatidylinositol + phosphatidylserine. The results indicate the redistribution of phospholipids fractions on the exterior of the biological membranes, but changes of choline-containing lipids and phosphatidylinositol contribute the increase the stickiness the lipid bilayer of red cells, which provides limitation of cadmium ions into the cell.

Key words: carp, red blood cells, phospholipids, cadmium

Рекомендує до друку

В.В. Грубінко

Надійшла 20.01.2012