

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

Роль фосфоліпідів мембран еритроцитів у формуванні резистентності організму риб до дії іонів кадмію

(Представлено академіком НАН України В. Д. Романенком)

*Досліджено зміни вмісту фосфоліпідів у мембранах еритроцитів коропа (*Cyprinus carpio* L.) та щуки (*Esox lucius* L.) за дії 0,005 і 0,02 мг/дм³ іонів кадмію. Виявлено перерозподіл холіновмісних фосфоліпідів, зниження вмісту фосфатидилінозиту та накопичення фосфатидилетаноламіну. Такі зміни вмісту фракцій фосфоліпідів обумовлені як безпосередньою дією металу на їх метаболізм, так і мобілізацією пулу відповідних фосфоліпідів з метою структурних перебудов ліпідного бішару в напрямку протидії впливу токсиканта, насамперед шляхом протидії проникненню цих іонів.*

В організмах гідробіонтів еволюційно сформувалися механізми біохімічної адаптації до хімічних чинників різного типу і рівня, а одним з таких до іонів металів є структурна перебудова ліпідного шару клітинних мембран [1]. Проте ліпідні характеристики клітинних мембран вивчені недостатньо, оскільки більшість досліджень проведено на вищих хребетних тваринах [2]. Щодо риб, то було досліджено роль ліпідів в адаптації до інших екологічних факторів: температури, солоності [3, 4]. Так, в роботі [1] вивчено адаптивні перебудови мембран клітин у напівпрохідних риб до зміни солоності води і відзначено важливу роль модуляції складу їх ліпідного бішару.

Ми ставили за мету встановити роль фосфоліпідів еритроцитів риб у адаптації до дії іонів кадмію — одного з найнебезпечніших забруднювачів водного середовища [5].

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus carpio* L.) та щуки (*Esox lucius* L.) масою 350–400 г. Риб утримували в акваріумах об'ємом 200 дм³ з відстояною водопровідною водою, яку змінювали щодобово, за таких умов: вміст О₂ — 7,5 ± 0,5 мг/дм³; СО₂ — 2,5 ± 0,3 мг/дм³; рН — 7,8 ± 0,1. У кожному акваріумі утримувалось по п'ять риб, яких протягом експерименту не годували. Період аклімації риб становив 14 діб.

Досліджували вплив Cd²⁺ у концентраціях 0,005 та 0,02 мг/дм³ Cd²⁺, що становить відповідно 0,5 та 2,0 рибогосподарських ГДК. Необхідну концентрацію іонів металу у воді створювали розчиненням солі CdCl₂ · 2,5H₂O кваліфікації “х. ч.”.

Цільну кров відбирали із серця ін'єкційною голкою та збирали в пробірки, оброблені розчином гепарину.

Для біохімічного дослідження вмісту ліпідів та їх окремих класів використані мембрани еритроцитів, які одержували шляхом осмотичного гемолізу в 0,01 М розчині натрію хлориду (співвідношення суспензії еритроцитів і гіпотонічного розчину — 1 : 50). Потім їх ресуспендували в цьому ж розчині і тричі відмивали в розчині Рінгера для холоднокровних тварин з подальшим центрифугуванням і відділенням супернатанту протягом 10 хв при 17000 г.

Екстрагування загальних ліпідів здійснювали за допомогою хлороформ–метанолу у відношенні 2 : 1 за методом Фолча. При цьому до однієї об'ємної частки мембран еритроцитів

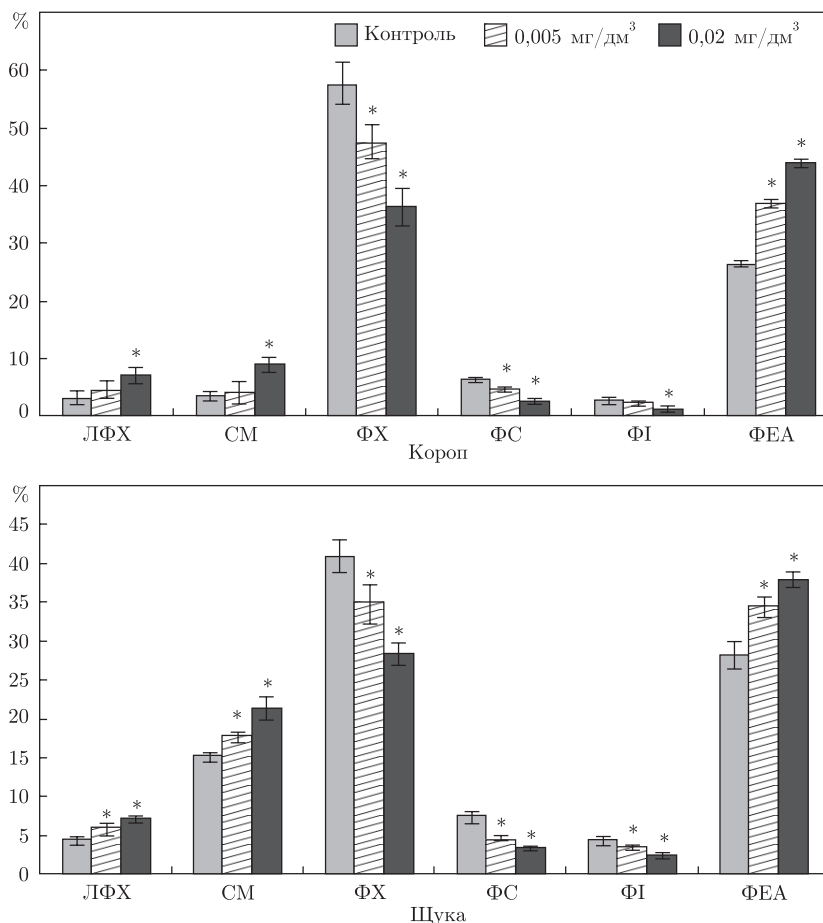


Рис. 1. Частка фосфоліпідів окремих фракцій в мембранах еритроцитів досліджуваних риб за дії підвищених концентрацій іонів кадмію.

* — різниця дослідних показників щодо контролю статистично достовірна ($p < 0,05$)

додавали 20 частин екстрагуючої суміші і залишали на 12 год для екстракції. Неліпідні домішки з екстракту видаляли відмиванням 1% розчином КСІ.

Розділення ліпідів на окремі фракції проводили методом висхідної одновимірної тонкошарової хроматографії на пластинках “Sorbfil”, які активували 30 хв при 105 °С в сушильній шафі. Розділення фракцій фосфоліпідів здійснювали в суміші хлороформ–метанол–льодяна оцтова кислота–дистильована вода у співвідношенні 60 : 30 : 7 : 3. Одержані хроматограми проявляли в камері, насиченій парами йоду. Для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти і очищені стандарти. Виявлено такі фракції: лізофосфатидилхолін (ЛФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилхолін (ФХ), сфінгомієлін (СМ) та фосфатидилінозитол (ФІ).

Вміст фосфоліпідів у мембранах еритроцитів визначали за кількістю неорганічного фосфору методом Васьковського [6].

Статистичну обробку даних здійснювали з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз одержаних результатів показав дозозалежний характер змін вмісту фосфоліпідів у мембранах еритроцитів досліджуваних риб (рис. 1).

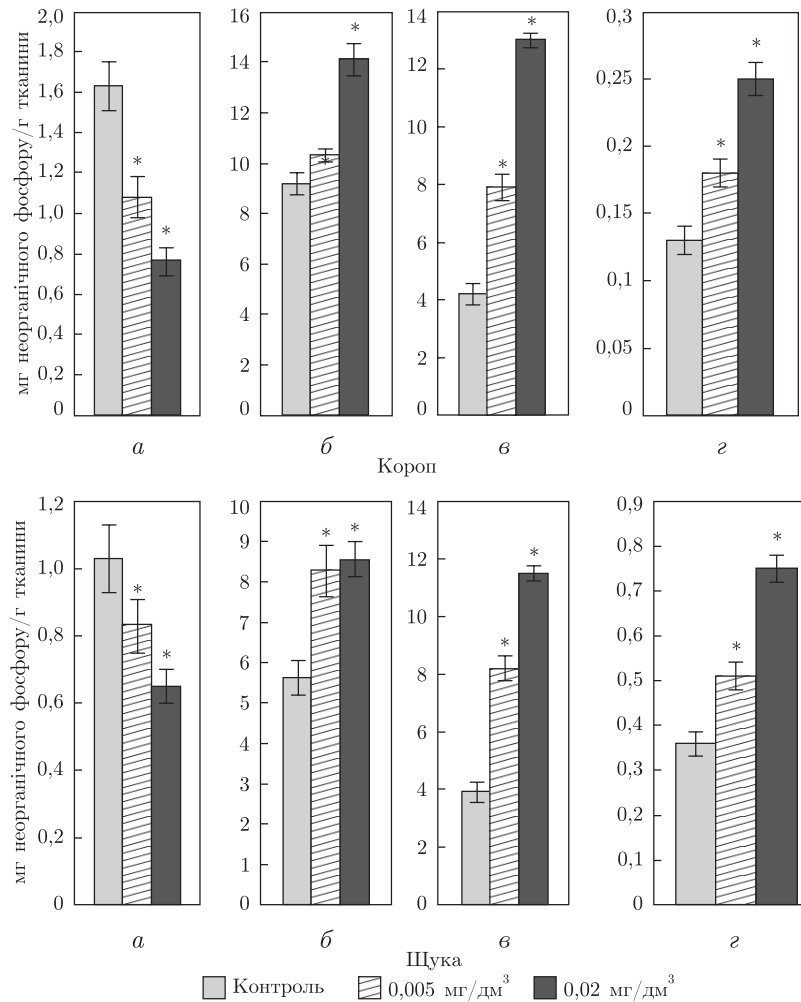


Рис. 2. Співвідношення вмісту фракцій фосфоліпідів в еритроцитах досліджуваних риб: а – ФХ/(ФЕА + ФС + ФІ); б – ФХ/ФС; в – ФЕА/ФС; г – СМ/ФХ

У результаті впливу 0,005 і 0,02 мг/дм³ Cd²⁺ вміст ФХ знизився в 1,21 і 1,59 раза в коропа та в 1,18 і 1,52 раза в щуки, а кількість ЛФХ зроста відповідно в 1,38 і 2,18 та в 1,34 і 1,64 раза. Такі зміни можуть бути викликані активацією іонами металу лізосомальної фосфоліпази А₂ [7]. Разом з тим зниження вмісту ФХ може бути пов'язане з посиленням синтезу СМ за участю церамідхолінфосфотрансферази [8]. Опосередкованим підтвердженням цього є накопичення СМ відповідно в 1,18 і 2,56 раза в коропа та в 1,17 і 1,41 раза в щуки. Збільшення вмісту СМ у мембранах сприяє їх ущільненню та, відповідно, зменшенню проникності для іонів металу [9].

Зростання кількості ФЕА в досліджуваній тканині коропа та щуки відповідно в 1,39 і 1,22 раза за дії 0,005 мг/дм³ та в 1,66 і 1,39 раза за дії 0,02 мг/дм³ металу ($p < 0,05$) може бути наслідком інгібування іонами кадмію специфічних метилаз [10], які каталізують синтез ФХ з ФЕА. Разом з тим збільшення вмісту ФЕА може бути обумовлено зниженням вмісту ФС внаслідок активації фосфатидилсериндекарбоксилази [11]. Загальна тенденція до зменшення вмісту ФІ в еритроцитах досліджуваних риб, ймовірно, є наслідком зростання активності фосфоліпази А₂, бо ФІ є неспецифічним субстратом для цього ензиму [11]

та фосфоліпази С [12]. Зміни фосфоліпідного спектра оцінювали на основі коефіцієнтів відношення вмісту фракцій фосфоліпідів.

За дії як 0,005, так і 0,02 мг/дм³ іонів кадмію встановлено значне зниження коефіцієнта [ФХ/(ФЕА + ФІ + ФС)] у мембранах еритроцитів коропа — відповідно в 1,50 і 2,14 раза, тоді як у щуки — лише 1,24 і 1,66 раза (рис. 2). Одержані результати свідчать про концентраційно залежне зростання вмісту фосфоліпідів внутрішнього та зниження кількості ліпідів зовнішнього шарів мембрани, що, очевидно, обумовлено одночасною дією фосфоліпази А₂ та ущільненням мембрани внаслідок накопичення ФЕА [8].

Заслужовує на увагу той факт, що за дії підвищених концентрацій кадмію значно зростає співвідношення 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.

Підвищення співвідношення СМ/ФХ у еритроцитах досліджуваних риб може вказувати на активацію синтезу СМ з ФХ та перерозподіл різних фосфоліпідів зовнішнього шару мембрани.

Отже, іони кадмію за дії допорогової (0,005 мг/дм³) та сублетальної (0,02 мг/дм³) концентрації викликають значні зміни вмісту різних фосфоліпідів у мембранах еритроцитів коропа та щуки. Вони обумовлені як безпосередньою дією металу на їх метаболізм, так і мобілізацією пулу відповідних фосфоліпідів з метою структурних перебудов ліпідного бішару в напрямку протидії впливу токсиканта, насамперед шляхом протидії проникненню цих іонів.

1. *Крепс Е. М.* Липиды клеточных мембран. – Ленинград: Наука, 1981. – 339 с.
2. *Филагина О. Л., Печенова Н. В.* Холестерин и биологические мембраны. – Москва: Мир, 1991. – 134 с.
3. *Малиновская М. В.* Особенности липидного и углеводного обмена у карпа при температурной акклимации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. – Киев, 1988. – 17 с.
4. *Смирнов Л. П., Богдан В. В.* Липиды в физиолого-биохимических адаптациях эктотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. – Москва: Наука, 2007. – 182 с.
5. *Satarug S., Baker J. R., Urbenjapol S. et al.* A global perspective on cadmium pollution and toxicity in nonoccupationally exposed population // *Toxicol. Lett.* – 2003. – **137**. – P. 65–83.
6. *Vaskovsky V. E., Kastetsky E. V., Vasedin I. M.* A universal reagent for phospholipids analysis // *J. Chromatogr.* – 1985. – **114**. – P. 129–141.
7. *Abe A., Kelly R., Shaymana J. A.* The measurement of lysosomal phospholipase A₂ activity in plasma // *J. Lipid Research.* – 2010. – **51**. – P. 2464–2470.
8. *Merrill A. H. Jr., Jones D. D.* An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism // *Bioch. et Biophys. Acta.* – 1990. – **1044**. – P. 1–12.
9. *Knoll W., Frank C. W., Heibel C. et al.* Functionalize the red lipid bilayers // *J. Biotechnol.* – 2000. – **74**. – P. 137–158.
10. *Vance D. E., Li Zh., Jacobs R. L.* Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology // *J. Boil. Chem.* – 2007. – **282**, No 46. – P. 33237–33241.
11. *Климов А. Н.* Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. Ч. 1. – Ст.-Петербург: Питер, 1999. – С. 55–56.
12. *Mahadevappa V. G., Holub B. J.* The molecular species composition of individual diacylphospholipids in human platelets // *Biochem. et Biophys. Acta.* – 1982. – **713**. – P. 73–79.
13. *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. and Phys.* – 2000. – **127**, Pt. B. – P. 391–397.

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

Роль фосфолипидов мембран эритроцитов в формировании резистентности организма рыб к действию ионов кадмия

*Исследованы изменения содержания фосфолипидов в мембранах эритроцитов карпа (*Cyprinus carpio* L.) и щуки (*Esox lucius* L.) при действии 0,005 и 0,02 мг/дм³ ионов кадмия. Выявлено перераспределение холинсодержащих фосфолипидов, снижение содержания фосфатидилинозитола и накопление фосфатидилэтаноламина. Такие изменения содержания фракций фосфолипидов обусловлены как непосредственным действием металла на их метаболизм, так и мобилизацией пула соответствующих фосфолипидов с целью структурных перестроек липидного бислоя в направлении противодействия влиянию токсиканта, прежде всего путем противодействия проникновению этих ионов.*

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

The role of erythrocyte membrane phospholipids in the formation of the resistance of fish organism to the action of cadmium ions

*The changes in the phospholipid content of erythrocyte membranes of carp (*Cyprinus carpio* L.) and pike (*Esox lucius* L.) by the action of 0.005 and 0.02 mg/dm³ cadmium ions are studied. The redistribution of choline-containing phospholipids, reduction of phosphatidylinositol, and phosphatidylethanolamine accumulation are revealed. Such changes in the phospholipids fraction content are due to a direct action of metal on their metabolism and a mobilization of the pool with the purpose of the respective phospholipid lipid bilayer structural rearrangements in the direction counter the influence of fluorine, especially by counteracting the penetration of these ions.*