

УДК 547.915: 639.215.2

Ю. І. Сенник

РОЛЬ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ У ЯДРАХ КЛІТИН М'ЯЗІВ ПРІСНОВОДНИХ РИБ У ПРОЦЕСАХ АДАПТАЦІЇ ДО ЙОНІВ ЦИНКУ ТА КАДМІЮ

Досліджено зміни вмісту ліпідів у ядрах клітин білих м'язів коропа (*Cyprinus carpio* L.) та щуки (*Esox lucius* L.) за дії йонів Zn^{2+} та Cd^{2+} . Встановлено, що дія обох металів викликає зміни вмісту неполярних ліпідів, окремих фракцій фосфоліпідів та їх співвідношення. Показано, що ці реакції спрямовані на мобілізацію пулу відповідних ліпідів з метою структурної модуляції ліпідного бішару для протидії прямому та опосередкованому впливу йонів металів.

Ключові слова: короп, щука, білі м'язи, ядра, неполярні ліпіди, фосфоліпіди.

Відомо, що у гідробіонтів наявні певні біохімічні механізми токсикорезистентності до йонів металів [30], одним з яких є перебудова ліпідного обміну. Більшість досліджень щодо впливу йонів металів на ліпідний обмін проводили на вищих хребетних тваринах [14], тоді як у риб вивчали переважно структурно-функціональну роль ліпідів у адаптації до фізичних і біологічних чинників [17].

Одним із важливих механізмів протидії впливу металів є перебудова ліпідного обміну загалом та структури біліпідного шару мембран зокрема [21]. У цьому контексті значний інтерес становлять зміни ліпідного складу клітинних ядер білих м'язів риб як показник розвитку патологічних станів в організмі [15]. Для дослідження було обрано цинк і кадмій (есенціальний і неесенціальний метали), механізми надходження яких у організм риб є схожими [8, 23].

Об'єктами дослідження були щука (*Esox lucius* L.) і короп (*Cyprinus carpio* L.). Оскільки вони є відповідно пелагічним та донним видом, метаболічна активність у білих м'язах у них різна. У попередніх дослідженнях було показано відмінності у накопиченні йонів цинку та кадмію цими видами [12].

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus carpio* L.) та щуки (*Esox lucius* L.) масою 250—300 г. Риб утримували по п'ять особин в акваріумах об'ємом 200 дм³ з відстояною водопровідною водою, яку змінювали щодві доби, за наступних умов: вміст O₂

$7,5 \pm 0,5$ мг/дм³; CO_2 $2,5 \pm 0,3$ мг/дм³; рН $7,8 \pm 0,1$. Період аклімації становив 14 діб. Під час експерименту риб не годували.

Досліджували вплив $0,5$ і $2,0$ мг/дм³ йонів Zn^{2+} та $0,005$ і $0,02$ мг/дм³ йонів Cd^{2+} , що становить відповідно $0,5$ та $2,0$ рибогосподарських ГДК. Необхідну концентрацію йонів у воді створювали розчиненням солей $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ кваліфікації «х. ч.».

Безпосередньо перед дослідженням риб забивали шляхом декапітації та проводили екстирпацію білих м'язів спини. Перед виділенням клітинних ядер тканину гомогенізували в охолоджену розчину такого складу: $0,22$ М сахароза, 10^{-4} М ЕДТА та $0,01$ М тріс-НСІ (рН $7,2$) у співвідношенні $1:5$. Використовували сахарозу «чда» та ЕДТА тріс («Мерк», Німеччина). Після центрифугування гомогенату при 2000 — 2500 об/хв протягом 20 хв одержували осад, який ідентифікували як ядерну фракцію. Виділення здійснено при $+4^\circ\text{C}$.

Загальні ліпіди екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю $2 : 1$ за методом Фолча [10]. При цьому до однієї об'ємної частки ядерної фракції додавали 20 частин суміші і залишали на 12 год для екстракції. Неліпідні домішки з екстракту видаляли шляхом відмивання 1% -ним розчином КСІ.

Неполярні ліпіди розділяли на окремі фракції методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії на пластинках «Sorbfil», які перед цим активували 30 хв при температурі 105°C у сушильній шафі. Рухомою фазою була суміш гексану, диетилового ефіру та льодяної оцтової кислоти у співвідношенні $70 : 30 : 1$. Одержані хроматограми проявляли у камері, насиченій парами йоду. Для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти і очищені стандарти. Виявлено такі фракції: фосфоліпіди (ФЛ), диацилгліцероли (ДАГ), холестерол (ХЛ), неетерифіковані жирні кислоти (НЕЖК), моноацилгліцероли (МАГ) і триацилгліцероли (ТАГ). Кількість неполярних ліпідів визначали біхроматним методом [10].

Розділення фосфоліпідів на окремі фракції проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії в герметичних камерах на пластинках «Sorbfil», які перед цим активували 30 хв при температурі 105°C у сушильній шафі. Для визначення фракцій фосфоліпідів пластинки елюювали у суміші хлороформу, метанолу, льодяної оцтової кислоти і дистильованої води 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), фосфатидилінозитол (ФІ) та кардіоліпін (КЛ). Вміст фосфоліпідів визначали за кількістю неорганічного фосфору за методом Васьковського [29].

Вміст цинку та кадмію в ядрах встановлювали на атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115 після спалювання матеріалу у перегнаній нітратній кислоті у співвідношенні $1:5$ (маса : об'єм) і виражали в нг/мг білка. Одержані дані оброблено статистично з використанням t -критерію Стьюдента.

Накопичення цинку і кадмію (нг/мг білка) в ядрах клітин м'язів коропа і щуки за період аклімації ($M \pm m, n = 5$)

Види риб	Контроль	0,5 ГДК	2 ГДК
Цинк			
Короп	24,5 ± 2,3	23,8 ± 1,8	36,6 ± 2,6*
Щука	46,04 ± 3,4	49,42 ± 2,9	67,9 ± 5,2*
Кадмій			
Короп	5,0 ± 0,2	6,1 ± 0,3	59,85 ± 3,8
Щука	92,1 ± 6,1	106,8 ± 8,3*	187,2 ± 9,5*

* Різниця з контролем статистично достовірна ($p < 0,05$)

Результати досліджень та їх обговорення

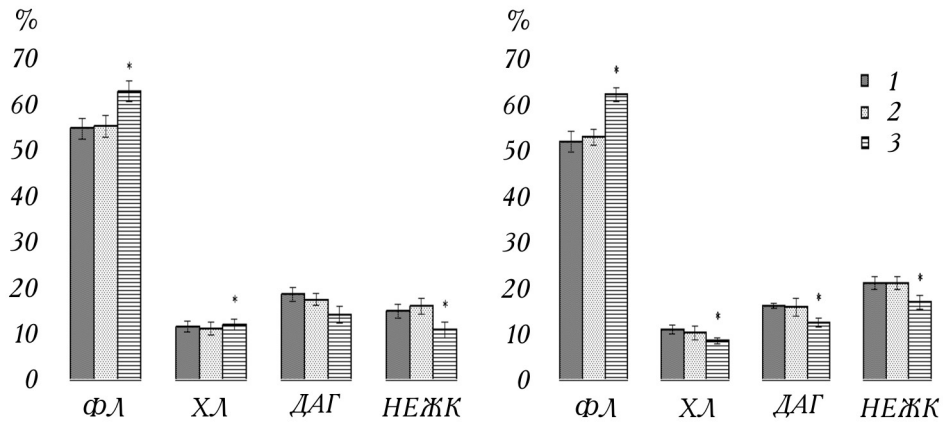
Накопичення йонів цинку та кадмію у ядрах клітин м'язів досліджуваних риб є дозозалежним і видоспецифічним (таблиця).

За дії 0,5 ГДК йонів обох металів достовірні зміни виявлено лише у ядрах клітин м'язів щуки — вміст кадмію збільшився в 1,16 разу. За дії 2 ГДК вміст йонів достовірно збільшився у ядрах клітин м'язів обох видів риб. Накопичення цинку та кадмію в ядерній фракції м'язів досліджуваних риб пов'язують з їх надходженням із цитоплазми як у вільному стані, так і у зв'язаній з металотіонеїнами формі [18]. Підтвердженням цього є окремі випадки локалізації металотіонеїнів у ядрах клітин м'язів [28]. Накопичення йонів Cd^{2+} у м'язах риб, ймовірно, зумовлено низьким вмістом мітохондрій, які є першочерговою цілью для металу [5], та значною загальною масою досліджуваної тканини.

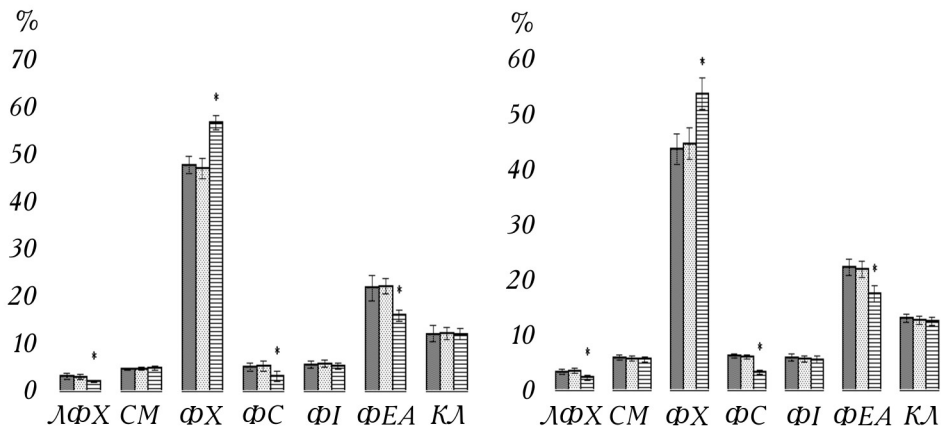
Вплив йонів цинку на співвідношення неполярних ліпідів у ядрах клітин білих м'язів досліджуваних риб. Достовірні зміни ліпідного складу ядер клітин м'язів коропа і щуки встановлено лише за дії 2 мг/дм³ йонів цинку (рис. 1). Відсутність модулюючого впливу 0,5 мг/дм³ цього металу зумовлена особливостями його тканинного перерозподілу, результатом чого є низький рівень його накопичення у м'язах.

За дії 2 ГДК цинку вміст ФЛ у ядрах клітин м'язів коропа та щуки зріс відповідно у 1,15 та 1,20 разу, опосередкованим підтвердженням активації їх синтезу є достовірне зниження кількості ДАГ і НЕЖК [13]. Такі зміни спрямовані, ймовірно, на зростання регуляції проникності мембран для йонів металів [2]. Достовірне зниження вмісту ХЛ у 1,29 разу у м'язах щуки разом з накопиченням фосфоліпідів сприяє збільшенню плинності біліпідного шару та зростанню регуляторної активності інтегральних білків мембран ядер [19].

Вплив йонів цинку на співвідношення окремих фракцій фосфоліпідів у ядрах клітин білих м'язів коропа та щуки. За дії 2 мг/дм³ Zn^{2+} відбувалась активація анаболічних перетворень фосфоліпідного компоненту ядер клітин



1. Вміст класів неполярних ліпідів у ядрах клітин м'язів коропа (а) і щуки (б) за дії йонів цинку ($M \pm m$, $n = 5$). Тут і на рис. 2—4: 1 — контроль; 2 — 0,5 ГДК; 3 — 2 ГДК.

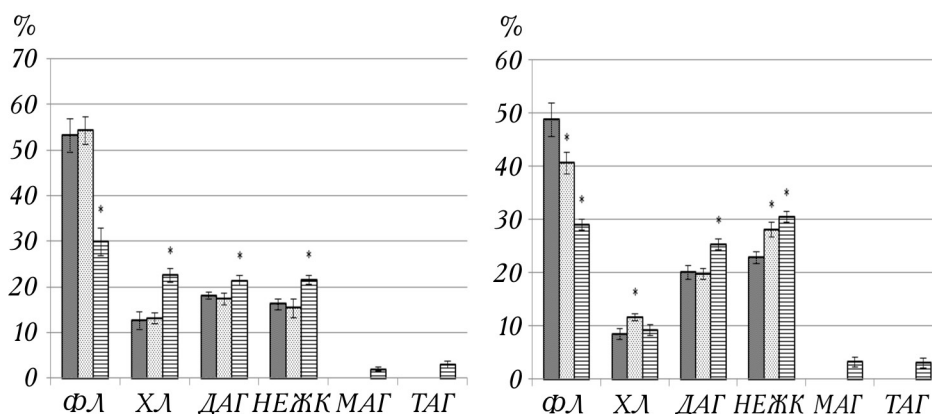


2. Вміст фракцій фосфоліпідів у ядрах клітин м'язів коропа (а) та щуки (б) за дії йонів цинку ($M \pm m$, $n = 5$).

м'язів досліджуваних риб. Це підтверджувалось достовірним зростанням вмісту ФХ у коропа і щуки відповідно у 1,23 і 1,19 разу та зниженням вмісту ЛФХ відповідно у 1,56 і 1,45 разу (рис. 2).

Накопичення ФХ може бути зумовлено інтенсифікацією метилювання ФЕА [22], підтвердженням чого є зниження його вмісту у коропа і щуки в 1,36 і 1,28 разу. Зменшення вмісту ФС відповідно в 1,65 та 1,94 разу, очевидно, є наслідком активації фосфатидилсериндекарбоксилази, у результаті чого відбувається поповнення пулу ФЕА [21].

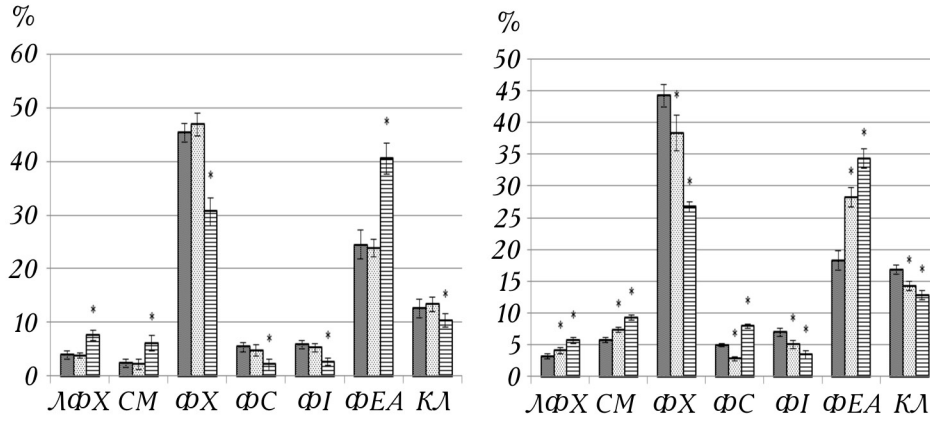
Вплив йонів кадмію на співвідношення неполярних ліпідів у ядрах клітин м'язів коропа та щуки. За дії 0,5 ГДК йонів Cd^{2+} достовірних змін ліпідного



3. Вміст класів неполярних ліпідів у ядрах клітин м'язів коропа (а) і щуки (б) за дії йонів кадмію ($M \pm m, n = 5$).

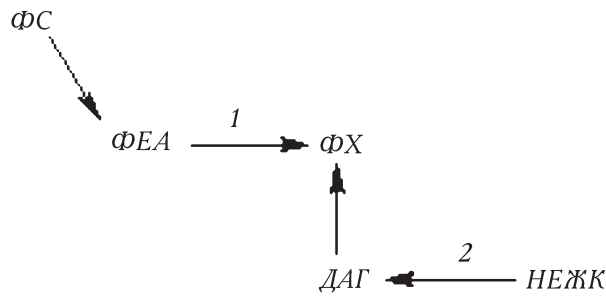
складу ядер клітин м'язів коропа не виявлено (рис. 3), що може бути обумовлено низьким рівнем кумуляції металу у цій тканині (див. таблицю). Достовірне зниження вмісту ФЛ м'язів та одночасне накопичення НЕЖК і ДАГ, а також поява МАГ у ядрах клітин обох видів вказують на активацію ліполізу [24]. Вміст ХЛ у коропа за дії 2 ГДК зріс у 1,79 разу, а у щуки за дії 0,5 ГДК — у 1,36 разу. Це можна розглядати як адаптивну відповідь на вплив токсиканту, бо відомо, що накопичення вільного ХЛ модифікує ультраструктуру біомембрани, змінюючи її проникність для йонів металів [16], та активність багатьох мембранозв'язаних ферментів [13]. Накопичення ТАГ, очевидно, є компенсаторною реакцією на зниження кількості фосфоліпідів і покликане збільшити мікрров'язкість біліпідного шару та знизити його проникність для йонів Cd^{2+} [20].

Вплив йонів кадмію на співвідношення фракцій фосфоліпідів у ядрах клітин м'язів коропа та щуки. У коропа за дії 2 ГДК Cd^{2+} та у щуки за дії обох концентрацій вміст ФХ знижувався відповідно в 1,48, 1,15 і 1,66 разу, у той же час кількість ЛФХ зростала в 1,93, 1,27 і 1,78 разу (рис. 4), що може бути пов'язано з активацією фосфоліпази A_2 [19, 22] та, ймовірно, церамідхолінфосфотрансферази цими йонами [26]. Останнє підтверджується достовірним зростанням вмісту СМ (відповідно в 1,85, 1,28 і 1,61 разу). Збільшення вмісту ФЕА у коропа за дії 0,5 ГДК Cd^{2+} в 1,66 та у щуки за дії 0,5 та 2 ГДК відповідно у 1,55 і 1,88 разу може бути зумовлено інгібуванням метилтрансфераз, які каталізують перетворення ФЕА у ФХ [1]. У коропа та щуки за дії 0,5 ГДК ці зміни були також наслідком активації фосфатидилсериндекарбоксилази [1], що підтверджувалось зниженням кількості ФС у 1,96 і 1,75 разу. У той же час за дії 2 ГДК у щуки вміст цього фосфоліпиду зростав у 1,61 разу через пригнічення його декарбоксилювання. Достовірне зниження вмісту ФІ у 2,20 разу у коропа та у 1,37 і 2,02 разу у щуки, ймовірно, було наслідком активації йонами кадмію фосфоліпази С [25] та фосфоліпази A_2 , для якої цей фосфоліпід є неспецифічним субстратом [23].



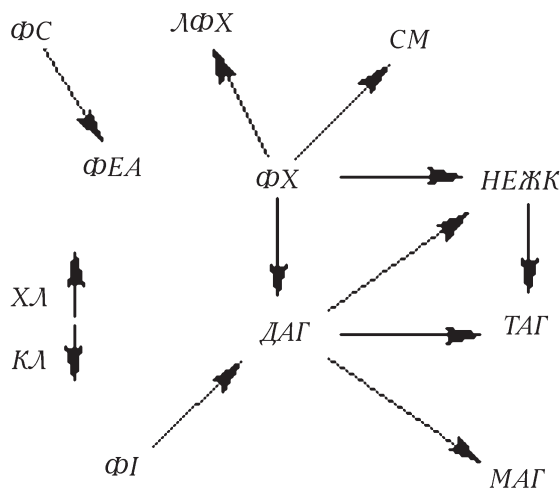
4. Співвідношення фракцій фосфоліпідів у ядрах клітин м'язів коропа (а) і щуки (б) за дії йонів кадмію ($M \pm m, n = 5$).

Перебудову ліпідного обміну у ядрах клітин білих м'язів риб за дії підвищених концентрацій йонів Zn^{2+} і Cd^{2+} можна зобразити у вигляді схем (рис. 5). Так, за дії 2 ГДК йонів цинку він перебудовується у напрямку накопичення ФХ внаслідок активації метилтрансфераз (1) та фосфохолін-цитидилтрансферази (2) [16]. Накопичення фосфоліпиду зовнішнього біліпідного шару можна вважати адаптивною відповіддю на дію металу, адже подібні зміни складу ліпідного бішару сприяють посиленню регуляції проникності біомембрани [4].



5. Схема ліпідного обміну в ядрах клітин м'язів коропа і щуки за дії 2 мг/дм³ йонів Zn^{2+} .

За дії обох досліджених концентрацій кадмію у щуки та 2 ГДК у коропа спостерігається зворотній характер перебудови ліпідного обміну в ядрах клітин м'язів (рис. 6). Вміст ФХ, ймовірно, знижується внаслідок активації йонами Cd^{2+} фосфоліпази A_2 . Опосередкованим підтвердженням цього є збільшення кількості продуктів його ферментативного гідролізу — ЛФХ і НЕЖК. Можливим поясненням зростання активності фосфоліпази є порушення цілісності лізосом через накопичення в них комплексу кадмій-металотіонеїни [7]. Таким чином, компенсаторною реакцією на деструкцію зовнішнього біліпідного шару клітинних ядер можна вважати синтез СМ, який пригнічує активність фосфоліпази [24] внаслідок зміни мембранної структури [9].



6. Схема ліпідного обміну в ядрах клітин м'язів коропа і щуки за дії підвищених концентрацій йонів Cd^{2+} .

Накопичення ФЕА і ХЛ покликано збільшити мікров'язкість мембран та, відповідно, знизити їх проникність [15]. Але, незважаючи на адаптивну роль ФЕА, його значне накопичення та одночасний гідроліз ФХ сприяють його появі на зовнішньому шарі мембран, внаслідок цього зростає її проникність і збільшується накопичення металу в органелі [10]. Зниження вмісту ФІ може бути компенсаторною реакцією на розвиток гіперкальцемії на фоні зростання кількості йонів кадмію [6], яка може призвести до надмірної експресії генів [28].

Достовірне зниження вмісту КЛ у клітинних ядрах риб, очевидно, можна розглядати як компенсаторну реакцію на дію йонів Cd^{2+} , оскільки безпосередня взаємодія цього ліпиду з нитками ДНК сприяє їх частковому розкручуванню, що підвищує ризик одноланцюгових розривів і хромосомних аберацій, індукованих активними формами кисню [11, 27]. Підтвердженням цього служить значне зростання вмісту МАГ і ТАГ (за нормальних умов вони містяться у слідових кількостях), що вказує на пошкодження ДНК і розвиток патологічних процесів у клітині [15].

Висновки

Таким чином, адаптація ліпідів ядер клітин м'язів риб спрямована на мобілізацію пулу їх відповідних фракцій з метою структурної модуляції біліпідного шару цих органел для протидії прямому та опосередкованому впливу йонів металів.

**

*Исследованы изменения содержания липидов в ядрах клеток белых мышц карпа (*Cyprinus carpio L.*) и щуки (*Esox lucius L.*) под воздействием ионов Zn^{2+} и Cd^{2+} . Установлено, что при воздействии обоих металлов изменяется содержание неполярных липидов, отдельных фракций фосфолипидов, а также их соотношение. Показано, что эти изменения направлены на мобилизацию пула соответствующих фракций с целью структурной модуляции липидного бислоя для противодействия влиянию ионов металлов.*

**

*The changes in the lipid content of the cell nuclei of white muscle of carp (*Cyprinus carpio* L.) and pike (*Esox lucius* L.) under the impact of Zn^{2+} and Cd^{2+} were studied. Content of non-polar lipids, phospholipids and relation of their fractions were shown to change under the impact of both metals. Lipid composition adaptation is aimed at mobilization of separate fractions pool in order to modulate lipid bilayer to counteract metal ions impact.*

**

1. Baranska J. Biosynthesis and transport of phosphatidylserine in the cell // Adv. lipids rev. — 1988. — Vol. 19, N 1. — P. 163—184.
2. Belyaeva E.A., Glazunov V.V., Korotkov S.M. Cd^{2+} -promoted mitochondrial permeability transition: a comparison with other heavy metals // Acta Biochim. Polonia. — 2004. — Vol. 51. — P. 545—551.
3. Bootman M.D., Thomas D., Tovey S.C. et al. Nuclear calcium signaling // Cell Mol. Life Sci. — 2000. — Vol. 57. — P. 371—388.
4. Chevreuil M., Carru A.M., Chesterikoff A. et al. Contamination of fish from different areas of the river Seine (France) by organic (PCB and pesticides) and metallic (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) micropollutants // Sci. Total Environ. — 1995. — Vol. 162. — P. 31—42.
5. Eide D.J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Nutr. — 2003. — Vol. 133. — P. 153—157.
6. Eichenberger E. The interrelation between essentiality and toxicity of metals in the aquatic ecosystem // Metalions in biological systems. — 1992. — Vol. 20, N 3. — P. 67—100.
7. 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.
8. Fotakis G., Cemeli E., Anderson D., Timbrell J.A. Cadmium chloride induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line // Toxicol. in vitro. — 2005. — Vol. 19. — P. 481—489.
9. Futerman A.H., van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2004. — Vol. 5. — P. 554—565.
10. Gulik-Krzywicki T. Structural studies of the associations between biological membrane components // Comp. Biochem. Physiol. — 1995. — Vol. 105, N 1. — P. 161—214.
11. 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. — Vol. 156B, N 1. — P. 35—42.
12. Hazel J.R., Landrey-Scott R. Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kidney // Am. J. Physiol. — 1988. — Vol. 255, N 4. — P. 622—634.
13. Hazel J.R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? // Annu. Rev. Physiol. — 1995. — Vol. 57. — P. 19—42.
14. Hogstrand C., Gassman N.J., Popova I. et al. The physiology of massive zinc accumulation in the liver of female squirrelfish and its relationship to reproduction // J. Exp. Biol. — 1996. — Vol. 199. — P. 2543—2554.
15. 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.

16. Killian J.A., van Meer G. The «double life» of membrane lipids // EMBO Reports. — 2001. — Vol. 21. — P. 91—95.
17. Li M., Kondo T., Zhao Q.-L. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 39702—39709.
18. Maraldi N.M., Zini N., Santi S., Manzoli F.A. Topology of inositol lipid signal transduction in the nucleus // J. Cell Physiol. — 1999. — Vol. 181. — P. 203—217.
19. Merrill A.H., Sweely C.C. Sphingolipid: metabolism and cell signalling // Biochem. of lipids, lipoproteins and membranes / Ed. by D.E. Vance, J.E. Vance. — Amsterdam: Elsevier Science, 1996. — P. 1—34.
20. Mouron S.A., Grillo C.A., Dulout F.N., Golijow C.D. A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and K-ras gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells // Mutat. Res. — 2004. — Vol. 568. — P. 221—231.
21. Olivera A., Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mutagens // Nature. — 1993. — Vol. 365. — P. 557—560.
22. Oyama Y., Noguchi S., Nakata M. et al. Exposure of rat thymocytes to hydrogen peroxide increases annexin V binding to membranes: inhibitory actions of deferoramine and quercetin // Eur. J. Pharmacol. — 1999. — Vol. 384. — P. 47—52.
23. 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. — 2000. — Vol. 127, N 2. — P. 391—397.
24. Qiao-qiao C.H.I., Guang-wei Z.H.U., Langdon A. Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China // J. Environ. Sci. — 2007. — Vol. 19. — P. 1500—1504.
25. Reynolds L.J., Hughes L.L., Louis A.I. et al. Metal ion and salt effects on the phospholipase A_2 , lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A_2 // Biochem. Biophys. Acta. — 1993. — Vol. 1167. — P. 272—280.
26. Rustenbeck I., Münster W., Lenzen S. Relation between accumulation of phospholipase A_2 reaction products and Ca^{2+} release in isolated liver mitochondria // *Ibid.* — 1996. — Vol. 1304. — P. 129—138.
27. Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B. DNA-bound lipids: composition and possible functions // Biochemistry (Moscow). — 1993. — Vol. 58. — P. 1154—1175.
28. Vance D.E., Vance J.E. Phospholipid biosynthesis in eukaryotes // Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. — Amsterdam: Elsevier Science, 1996. — P. 205—232.
29. Vaskovsky V.E., Kastetsky E.V., Vasedin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatogr. — 1985. — Vol. 114. — P. 129—141.
30. Wang F., van Brocklyn J.R., Hobson J.P. et al. Sphingosine-1-phosphate stimulates cell migration through a G_i -coupled cell surface receptor // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274. — P. 35343—35350.