

УДК 547.915: 639.215.2

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

### ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД МІТОХОНДРІЙ КЛІТИН ЗЯБЕР ЩУКИ (*ESOX LUCIUS*) ЗА ДІЇ ЙОНІВ ЦИНКУ

Досліджено зміни фосфоліпідного складу мітохондрій клітин зябер щуки за дії йонів  $Zn^{2+}$  у концентрації 0,5 та 2 мг/дм<sup>3</sup>. Встановлено, що вплив металу викликає концентраційнозалежні зміни вмісту окремих фракцій фосфоліпідів. Розглядається роль фосфоліпідів мітохондрій зябер у аклімації риб до дії йонів цинку.

**Ключові слова:** щука, мітохондрії, фосфоліпіди, цинк.

У водних організмів йони есенціальних металів регулюють ряд молекулярних процесів у клітинних мембранах, насамперед органів, що контактують із водним середовищем. Разом з тим ці метали в кількостях, що перевищують фізіологічно-виправдані рівні, виражено токсичні [1]. Особливий інтерес становить дослідження впливу розчинених у воді солей металів на різні ланки метаболізму мембранних ліпідів. З огляду на те, що йони металів можуть проникати в організм активно плаваючих риб і змінювати спрямованість багатьох обмінних процесів [2], метою наших досліджень було вивчення змін ліпідного складу мембран мітохондрій зябер щуки за дії підвищеної концентрації йонів цинку.

**Матеріал і методика досліджень.** Дослідження проводили на щуці (*Esox lucius* 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  $O_2$   $7,5 \pm 0,5$  мг/дм<sup>3</sup>, вміст  $CO_2$   $2,5 \pm 0,3$  мг/дм<sup>3</sup>, рН  $7,8 \pm 0,1$ ).

Досліджували ліпідний склад мітохондрій зябер за дії йонів цинку в концентрації 0,5 і 2,0 мг/дм<sup>3</sup>, що відповідає 0,5 та 2,0 рибогосподарським ГДК. Необхідні концентрації йонів металів у воді створювали внесенням солі  $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$  кваліфікації «х. ч.». Період аклімації риб становив 14 діб. Під час експерименту риб не годували.

Виділення мітохондрій із зябрових клітин проводили центрифугуванням у 0,22 М сахарозі. Ліпіди екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю (2 : 1) за Фолчем [3]. Розділення фосфоліпідів на фракції здійснювали методом висхідної одномірної мікротонкошарової хроматографії на пластинках «Sorbfil», рухомою фазою була суміш хлороформу, метанолу, льодяної, оцто-

© Ю. І. Сенник, В. О. Хоменчук, В. З. Курант, В. В. Грубінко, 2013

вої кислоти та дистильованої води (60 : 30 : 7 : 3). Виявлено такі фракції фосфоліпідів: лізофосфатидилхолін (ЛФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилхолін (ФХ), сфінгомієлін (СМ), фосфатидилінозитол (ФІ). Їх кількість визначали за методом Васьковського [4].

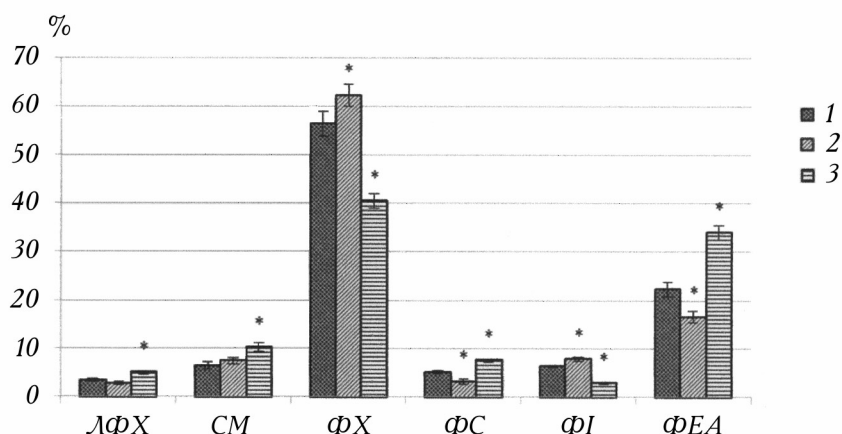
Активність цитохромоксидази (ЦО) встановлювали за Штраусом [5]. Вміст цинку визначали у спалених у перегнаній нітратній кислоті мітохондріях (у співвідношенні 1 : 5 — маса : об'єм) на атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115 і виражали в нг/мг білка. Одержані дані оброблено статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента.

### Результати досліджень та їх обговорення

За впливу 0,5 ГДК  $Zn^{2+}$  вміст ФХ в мітохондріях зябер достовірно зростає у 1,12 разу, що, можливо, пов'язано з активацією специфічних метилтрансфераз [6]. Підтвердженням цього припущення є зниження у 1,39 разу кількості ФЕА. Зменшення у 1,82 разу ( $p < 0,05$ ) вмісту ФС, ймовірно, є результатом активації фосфатидилсериндекарбоксилази, що сприяє поповненню пулу фосфатидилетаноламіну (рисунок).

Достовірне зростання кількості ФІ у 1,23 разу може бути зумовлено посиленням контролю метаболічних процесів, оскільки відомо, що допорогові концентрації йонів  $Zn^{2+}$  є активаторами мітохондріальних ферментів [7].

За дії 2 ГДК спостерігались протилежні зміни кількості досліджуваних фосфоліпідів: вміст ФХ знижувався у 1,47 разу, що, очевидно, є наслідком зростання активності фосфоліпази  $A_2$  внаслідок її активації йонами  $Zn^{2+}$  [8]. Це припущення підтверджується зростанням у 1,44 разу вмісту ЛФХ — продукту ферментативного гідролізу ФХ. Збільшення кількості ФЕА у 1,61 разу спричинене інгібуванням  $Zn^{2+}$ -метилаз, внаслідок чого знижується інтенсивність залучення цього фосфоліпиду до процесів біосинтезу [9]. Вміст ФС



Співвідношення фракцій фосфоліпідів у мітохондріях зябер щуки за дії  $Zn^{2+}$ . 1 — контроль; 2 — 0,5 ГДК; 3 — 2 ГДК.

**Ввідношення ФХ/ФЕА, кількість накопиченого металу та активність цитохромоксидази у мітохондріях зябер щуки за дії  $Zn^{2+}$  ( $M \pm m, n = 5$ )**

Концентрація $Zn^{2+}$	ФХ/ФЕА	Вміст $Zn^{2+}$ , нг/мг білка	Активність ЦО, мкг/мг за 20 хв
Контроль	$2,52 \pm 0,21$	$163,8 \pm 12,9$	$167,7 \pm 5,5$
0,5 мг/дм <sup>3</sup>	$3,76 \pm 0,17^*$	$189,7 \pm 9,9^*$	$272,8 \pm 10,3^*$
2 мг/дм <sup>3</sup>	$1,19 \pm 0,11^*$	$346,7 \pm 15^*$	$89,4 \pm 6,4^*$

\* Результат достовірний.

зріс у 1,48 разу внаслідок інгібування йонами металу його декарбоксілювання.

Достовірне збільшення у 2,06 разу вмісту ЛФХ, очевидно, зумовлено активацією йонами металу перетворення ФХ у СМ за участю церамідхолінфосфотрансферази [9] для збільшення мікров'язкості мембран і зниження їх проникності для  $Zn^{2+}$ . Вміст ФІ знижувався у 2,21 разу, що може бути наслідком активації йонами цинку фосфоліпази  $A_2$ , для якої цей фосфоліпід є неспецифічним субстратом [10].

Для перевірки ефективності зазначених змін фосфоліпідного складу мітохондрій щуки розраховано відношення ФХ/ФЕА, що вказує на проникність біомембрани [11], визначено рівень накопичення металу в цій організмі та встановлено ферментативну активність цитохромоксидази, яка є вкрай чутливою до дії йонів цинку [12] (таблиця).

Встановлено пряму залежність між зміною фосфоліпідного складу, рівнем накопичення металу та активністю ЦО. Так, за дії 0,5 ГДК металу відношення ФХ/ФЕА достовірно зростало, що вказує на зниження проникності мембран. Це сприяло акумулюванню  $Zn^{2+}$ , що, ймовірно, у поєднанні зі збільшенням вмісту ФІ, індукувало зростання активності ЦО. Натомість за дії 2 ГДК відношення ФХ/ФЕА знижувалось, тобто проникність мембран збільшувалась, а активність ЦО зменшувалась. Отже, незважаючи на адаптивну роль, значне накопичення ФЕА з одночасним гідролізом ФХ фосфоліпазою  $A_2$  сприяло його появі на зовнішньому шарі клітинної мембрани, внаслідок чого структура біліпідного шару змінювалась [13], збільшуючи його проникність [14].

### **Висновки**

Роль фосфоліпідів мітохондрій зябер щуки у аклімації до дії  $Zn^{2+}$  полягає у мобілізації пулу відповідних фосфоліпідів з метою структурної перебудови біліпідного шару в напрямку протидії впливу токсиканту. Так, за дії допорогової концентрації металу (0,5 ГДК) спостерігається накопичення ФЛ зовнішнього шару мембрани та ФІ, що модулює її проникність на рівні мембран-зв'язаних ферментів. Натомість накопичення СМ і ФЕА та одночасне зниження вмісту ФІ за впливу 2 ГДК, очевидно, покликані обмежити надходження йонів металу у клітину

завдяки збільшенню мікров'язкості її мембрани та зниженню кількості регуляторних сайтів  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів.

\*\*

*Исследованы изменения фосфолипидного состава митохондрий клеток жабр щуки при воздействии ионов  $\text{Zn}^{2+}$  в концентрации 0,5 и 2 мг/дм<sup>3</sup>. Установлены изменения содержания отдельных фракций фосфолипидов. Рассматривается роль фосфолипидов митохондрий жабр рыб в акклимации к ионам цинка.*

\*\*

*The changes of the lipids' content in mitochondrial membranes of the pike gills under elevated concentration of zinc ions were studied. Zinc ions were found to change content of individual phospholipid fractions. The role of mitochondrial phospholipids in the fish adaptation to zinc ions is discussed.*

\*\*

1. Ганзюра В.П., Грубінко В.В. Концепція шкодочинності в екології. — Тернопіль: Вид-во Терноп. нац. пед. ун-ту, 2008. — 144 с.
2. Sargent J.R., Williamson I.P., Towse J.B. Metabolism of mevalonic acid in the liver of the dogfish *Scyliorhinus caniculus* // Biochem. J. — 1998. — Vol. 117, N 2. — P. 24—26.
3. 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.
4. Vaskovsky V.E., Kastetsky E.V., Vasedin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatogr. — 1985. — Vol. 114. — P. 129—141.
5. Straus W. Colorimetric microdetermination of cytochrome-c oxidase // J. Biol. Chem. — 1954. — Vol. 207, N 2. — P. 733.
6. Kodaki T., Yamashita S. Phosphatidylethanolamine methylation pathway // Ibid. — 1987. — Vol. 262. — P. 15428—15435.
7. Amaguchi M., Ura M., Okada S. Role of zinc as an activator of mitochondrial function in rat liver // Biochem. Pharmacology. — 1982. — Vol. 31, N 7. — P. 1289—1293.
8. Lindahl M., Tagesson Ch. Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) binds to and stimulates the activity of group I but not group II phospholipase  $\text{A}_2$  // Inflammation. — 1996. — Vol. 20. — P. 599—611.
9. Leslie J.M., Buckley J.T. Phospholipid composition of gold fish (*Carassius auratus* L.) liver and brain and temperature-dependence of phosphatidylcholine synthesis // Comp. Biochem. Physiol. — 1986. — Vol. 53B, N 3. — P. 335—337.
10. 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.
11. Dennis E., Li Z., Jacobs R.L. Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology // J. Biol. Chem. — 2007. — Vol. 282, N 46. — P. 33237—33241.

12. *Dowhan W., Bogdanov M.* Functional roles of lipids in membranes // *New Comprehensive Biochemistry*. — 2002. — Vol. 36. — P. 1—35.
13. *Li Z., Agellon L.B., Allen T.M. et al.* The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis // *Cell Metabolism*. — 2006. — Vol. 3 — P. 321—331.
14. *Mills D.A., Schmidt B., Hiser C. et al.* Membrane potential-controlled inhibition of cytochrome-c oxidase by zinc // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 14894—14901.

Тернопільський національний  
педагогічний університет

Надійшла 14.03.13