

ЕКОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 577.41.597.554.3

В.О. Хоменчук

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

ОСОБЛИВОСТІ СУБКЛІТИННОГО РОЗПОДІЛУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ В ДЕЯКИХ ТКАНИНАХ КОРОПА ПРИ ДІЇ ЇХ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

водне середовище, важкі метали, гідробіоти, субклітинні фракції

У комплексному екомоніторингу територій провідна роль належить оцінці стану водних екосистем, в яких у підсумку відбувається накопичення біополітантів, токсичних продуктів антропогенної діяльності, їх акумуляція та фіксація. Серед політантів хімічного походження одні з провідних місць займають важкі метали.

Водні організми володіють властивістю накопичувати іони металів до рівнів, які значно перевищують їх фізіолого-біохімічні потреби, не зважаючи на функціонування складних механізмів регуляції процесів акумулювання. Разом з тим, накопичення важких металів в організмі риб має тканинні особливості, що зумовлюється низкою зовнішніх та внутрішніх факторів [1, 3]. Можна припустити, що перерозподіл металів в організмі проходить не лише на тканинному, а і на клітинному рівні. Завданням нашого експерименту були дослідження особливостей накопичення важких металів в організмі коропа (*Cyprinus carpio L.*) та їх перерозподіл між субклітинними елементами печінки, зябер та м'язів при дії сублетальних концентрацій іонів міді, цинку, марганцю і свинцю.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проведено на дворічках коропа масою 200-250 г., які утримувалися в акваріумах ємністю 200 л. Вміст кисню в воді акваріумів підтримували на рівні 7,0 — 8,0 мг/л, вуглекислого газу — 2,2-2,8 мг/л. Величина рН і коливалась в межах 7,7-7,9. Риби перебували в середовищі, в якому вміст досліджуваних металів відповідав 2 рибогосподарським ГДК (Cu^{2+} — 0,2 мг/л, Zn^{2+} — 2 мг/л, Mn^{2+} — 2,4 мг/л, Pb^{2+} — 0,2 мг/л). Метали вносили у воду в складі солей MnCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 та $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Період аклімації становив 14 діб, що вважається достатнім для формування адаптивних захисних механізмів при дії вищевказаних токсикантів [5]. Досліджували рівень накопичення металів в мітохондрійній, цитоплазматичній та ядерній фракціях печінки, зябер та спинних м'язів.

Для визначення вмісту міді, цинку, марганцю та свинцю субклітинні компоненти спалювали в перегнаній азотній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса об'єм). Концентрацію металів вимірювали на атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115 і виражали в нг/мг білку. Вміст білку в пробах визначали за методом Лоурі та співайт [11]. Одержані цифрові дані опрацьовували статистично [4].

Результати досліджень та їх обговорення

Одержані результати показують, що вміст металів в досліджуваних субклітинних компонентах при фізіологічній нормі коливається в досить широких межах. Аналогічно за дії

підвищених концентрацій металу, характерний різний ступінь акумулювання металів органелами, в залежності від їх функціонального призначення.

Так, якщо проаналізувати вміст міді в субклітинних фракціях печінки корона (табл. 1), то можна побачити, що при дії підвищеної концентрації металу в середовищі вміст його зростає в 1,7 рази в ядерній фракції. Наші дані угоджуються з дослідженнями авторів [10], якими було встановлено, що в печінці окуня більше 90% міді знаходилось в ядерній мембрані у вигляді «рану».

Аналогічна тенденція спостерігається в мітохондріях в яких вміст металу зростає в 3,1 рази. Дослідники [6] встановили, що при дії підвищених концентрацій міді спостерігається набування мітохондрій, розрив їх крист і вакуолізація матриксу, зменшення щільності цитоплазми, що зумовлено значним накопиченням металу. Звертає на себе увагу той факт, що в цитоплазматичній фракції має місце тенденція до зменшення вмісту міді в 1,3 рази, що на нашу думку, можна пов'язати із зменшенням об'єму цитоплазми в цілому.

Таблиця 1

Вміст міді в окремих фракціях клітин зябер, печінки і м'язів корона при дії іонів міді (нг/мг білку, $M \pm m$, $n=5$)

Групи риб	Субклітинні фракції		
	Ядерна	Мітохондрійна	Цитоплазматична
ПЕЧІНКА			
Контроль	120,0±30,0	80,0±4,0	220,0±39,0
2 ГДК	200,0±30,0	250,0±23,0*	130,0±26,0*
ЗЯБРИ			
Контроль	43,0±6,0	31,0±2,0	10,0±5,0
2 ГДК	99,0±7,0*	72,0±9,0*	120,0±20,0*
М'ЯЗИ			
Контроль	14,0±4,0	96,0±20,0	28,0±3,0
2 ГДК	7,0±1,0	280,0±80,0	25,0±1,0

Примітка * - тут і в таблицях 2,3,4 відхилення порівняно з контролем статистично достовірні ($p < 0,05$)

Дана гіпотеза підтверджується дослідженнями авторів [14] якими при цитотоксикації сублетальними концентраціями міді виявлено зменшення об'єму цитоплазми і збільшення кількості лізосом.

Найбільш яскраво пряма залежність між концентрацією металу в середовищі і його накопиченням в організмі проявляється в зябрах. У всіх фракціях клітин зябер при експозиції в середовищі 0,2 мг/л міді спостерігається значне підвищення рівня металу: у ядерній — в 2,3, в мітохондріальній в 2,2; в цитоплазматичній в 3 рази. Очевидно, це пояснюється безпосереднім контактом зябер з водним середовищем, що підтверджує гіпотезу про надходження металів з води шляхом фізико-хімічної сорбції в зяброві клітини з їх подальшим перерозподілом в організмі [3].

Для мітохондрій м'язів характерним є зростання кількості металу в 3 рази, в ядерній фракції зменшення його кількості в 2 рази, в той час як в цитоплазмі значного відхилення від контролю не відмічено. Очевидно, це можна пояснити тим, що мідь, як елемент, який змінює ступінь окислення, в мітохондріях бере участь в окисно-відновних процесах [15]. Можна припустити, що мідь зв'язується ферментами дихального ланцюга мітохондрій, тому що при токсичній дії хлориду міді виявлено активацію анаеробного та інгібування аеробного шляху утворення енергії [7].

Щодо цинку, то для цього металу рівень в субклітинних фракціях в середньому на один-два порядки вищий від вмісту решти досліджуваних металів (табл. 4)

За рівнем зростання концентрації цинку, в розрахунку на білок, клітинні компоненти як печінки так і м'язів можна розмістити в такому порядку ядра<мітохондрії<цитоплазма. За дії сублетальної концентрації металу ми спостерігали незначне зростання його в усіх фракціях печінки. Майже аналогічна картина, за винятком мітохондрій, де концентрація металу зменшується, спостерігається для субклітинних компонентів зябер. В ряді досліджень встановлено, що цинк переважно потрапляє в організм гідробіонтів з їжею через кишківник

[8,16]. З огляду досить високий вміст цинку в клітинах печінки і зябер і, одночасно, незначне його накопичення при дії сублетальних концентрацій металу, можна відмітити надзвичайно високий рівень регуляції вмісту цинку та систем його переносу при дії його підвищених концентрацій в водному середовищі. Відомо, наприклад, що для *Gundulus heteroclitus* накопичення кадмію при його концентрації в воді менше 100 мкг/л не відбувається, тобто здійснюється фізіологічна регуляція вмісту металу [9]. Для клітин м'язів характерний дещо інший розподіл цинку. Відбувається незначне зменшення його вмісту в цитоплазмі та ядрах, і зростання в два рази рівня металу в мітохондріях. У загальному можна сказати, що в найзначніше накопичення цинку проходить в мітохондріях м'язів.

Таблиця 2

Вміст цинку в окремих фракціях клітин зябер, печінки і м'язів коропа при дії іонів цинку (нг/мг білку, $M \pm m$, $n=5$)

Групи риб	Субклітинні фракції		
	Ядерна	Мітохондрійна	Цитоплазматична
ПЕЧІНКА			
Контроль	651,0±67,0	1111,0±140,0	1365,0±305,0
2 ГДК	675,0±136,0	1240,0±154,0	1567,0±128,0
ЗЯБРИ			
Контроль	1212,0±129,0	2498±289,0	1823,0±181,0
2 ГДК	1421,0±252,0	2358,0±211,0	1996,0±139,0
М'ЯЗИ			
Контроль	46,0±7,0	71,0±17,0	128,0±15,0
2 ГДК	39,0±7,0	140,0±21,0*	117,0±14,0

Найвищий абсолютний вміст марганцю спостерігається в мітохондріях, за винятком ядерної фракції зябер, де рівень металу є найвищим (табл. 3). Порівняно низький рівень металу відмічено для цитоплазми.

Таблиця 3

Вміст марганцю в окремих фракціях клітин зябер, печінки і м'язів коропа при дії іонів марганцю (нг/мг білку, $M \pm m$, $n=5$)

Групи риб	Субклітинні фракції		
	Ядерна	Мітохондрійна	Цитоплазматична
ПЕЧІНКА			
Контроль	8,2±2,6	14,1±3,4	4,3±0,5
2 ГДК	22,3±3,6	18,5±2,0	7,4±1,0
ЗЯБРИ			
Контроль	36,6±7,5	13,5±0,6	1,6±0,2
2 ГДК	163,0±14,6*	24,8±2,4*	5,9±0,8*
М'ЯЗИ			
Контроль	1,56±0,6	14,1±4,2	7,3±0,7
2 ГДК	3,13±0,5	7,6±1,2	6,4±1,2

За інтоксикації іонами марганцю проходить активна його акумуляція у всіх фракціях, за винятком мітохондрій і цитоплазматичної фракції м'язів. Особливо чітко це прослідковується в ядрах, де його вміст збільшується в 2,7 рази в печінці, в 4,4 — в зябрах і в 2 рази в м'язах. Застуговує на увагу той факт, що значне накопичення металу в мітохондріях спостерігається лише для зябер, а для мітохондрій м'язів взагалі характерне зменшення його рівня майже в 2 рази. Відомо, що мітохондрії в умовах вітального вітро мають здатність накопичувати Mn^{2+} , де він може зв'язуватись з АТФ і впливати на енергетику клітини в цілому [2]. Очевидно, що в нашому випадку протягом 14 діб інтоксикації сублетальними концентраціями металу виробляються адаптивні механізми регуляції вмісту марганцю в мітохондріях, а отже і енергетичного статусу клітини в цілому. З огляду на значне зростання його вмісту в ядерній фракції, ймовірно, що проходить його перерозподіл між мітохондріями та ядрами. Це особливо чітко прослідковується в зябрах — органі, безпосередньо межуючому з навколишнім середовищем,

де рівень металу в ядерній фракції з розрахунку на білок в 27 раз переважає його рівень в цитоплазмі і в 6,5 рази в мітохондріях.

Значний інтерес становлять дані, отримані при інтоксикації організму риб свинцем (табл. 4). Слід відмітити, що при дії його сублетальних концентрацій не проходить накопичення металу в субклітинних фракціях печінки. Очевидно, що печінка не виконує депонуючої функції для свинцю, а вже відомо, що цей метал є типовим токсикантом.

Таблиця 4

Вміст свинцю в окремих фракціях клітин зябер, печінки і м'язів коропа при дії іонів свинцю ($\mu\text{g}/\text{ml}$ білку, $M \pm m$, $n=5$)

Групи риб	Субклітинні фракції		
	Ядерна	Мітохондрійна	Цитоплазматична
ПЕЧІНКА			
Контроль	12,8±2,5	10,7±0,9	9,1±1,8
2 ГДК	13,9±0,9	11,5±0,7	11,1±1,3
ЗЯБРИ			
Контроль	17,1±3,7	9,1±2,2	14,3±1,7
2 ГДК	37,8±16,4	25,6±2,1*	22,2±4,2
М'ЯЗИ			
Контроль	3,6±1,4	9,4±1,1	15,4±2,8
2 ГДК	2,0±0,1	9,8±1,4	23,8±4,4

Аналогічні закономірності характерні і для м'язів, де лише в цитоплазматичній фракції має місце незначна акумуляція металу. Попередні дослідження констатують досить високу стійкість до дії свинцю дорослих риб [14], в той час, як для риб на більш ранній стадії розвитку він є надзвичайно токсичним [9]. Дослідження авторів [13] показують, що після введення дзеркальним коропам свинцю спостерігається найбільше його концентрування в кістках.

Відсутність прямого зв'язку між концентрацією в воді і накопиченням в організмі коропа може бути зумовлено виключно хімічними причинами. Відомо, що при досить низьких концентраціях свинцю утворює нерозчинний осад, який є малодоступним для піддослідних риб. У зябрах спостерігається значне накопичення металу у всіх фракціях, особливо, мітохондріальній. Можна припустити, що зябра відіграють основну роль у зв'язуванні свинцю з наступним його виведенням з організму ще до того, як він потрапить в інші органи. Відомо, що в зябрах свинець накопичується в інертній формі у виді кристалічних відкладів в базальній пластині, зв'язаний із кальцієм у співвідношенні 1:1 [12]. Такі системи захисту характерні не лише для свинцю. Так, при інтоксикації алюмінієм в цитоплазматичних вакуолях респіраторних і хлоридних клітинах зябер було виявлено відклади електронноопильних частинок [17]. Описаний захисний механізм підвищує толерантність гідробіонтів до токсичних рівнів металів у водному середовищі та активує їх адаптивні можливості.

Висновки

Накопичення важких металів субклітинними компонентами залежить від природи металу, його фізіологічної ролі в організмі, функціонального призначення органів та ряду інших зовнішніх і внутрішніх факторів. Відмічено досить високий рівень акумулювання металів в ядерних фракціях досліджуваних тканин, де вони, очевидно, знаходяться в вигляді уцілюєння, в результаті чого проходить їх інактивація і підвищення толерантності організму до дії важких металів. Виходячи з визначення токсичності як рівня накопичення металу в метаболічно-активних структурах найбільш токсичним з досліджуваних металів є мідь. Особливо відсутною є її дія на мітохондрії, а отже і на енергетичний статус клітини в цілому. Найнижчий рівень акумулювання досліджуваних металів характерний для ядерної фракції м'язів.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Евтушенко Н Ю Биоаккумуляция микроэлементов в органах и тканях рыб с различным типом питания при гелловом выращивании // Гидробиол журн — 1996 — Т 32, №3 — С 89-102
- 2 Ленинджер А Биохимия М Мир, 1974 — 960 с
- 3 Патин С А, Морозов Н П Микроэлементы в морских организмах и экосистемах. — М Легк и пищ пром-сть, 1981 — 152 с
- 4 Соппи С Ф, Виноградова Р П Основы биохимичних методів дослідження. — К Вища школа, 1975 — 244 с
- 5 Хлебович В В Акклимация животных организмов Л Наука, 1981 — 135 с
- 6 Abbas A K, Shackley S F, King P E Effects of copper on the ultrastructure of brain cells of Atlantic herring *Clupea harengus* L // Pakistan J Zool — 1995 — Vol 27, N 3 — P 203-206
- 7 Balavenkatassubariah M, Rani A Usha, Geethanjali K, Purushotham K R Effect of cupric chloride on oxidative metabolism in the fresh water teleost, *Tilapia mossambica* // Ecotoxicol and Environ Safety — 1984 — Vol 8, N 3 — P 289-293
- 8 Bauden Jean-Pier Accumulation simultanee par les voies dure et tropique du ⁶⁵Zn par *Cyprinus carpio* L // Acta ecol appl — 1985 — Vol 6, N 3 — P 259-268
- 9 Bernhard M, Zattera A Major pollutants in the marine environment/ "Marine pollution and marine waste disposal" Proc 2nd Intern Congress. San-Remo, 17-21 Dec 1973, Pergamon Press, 1975 — P 195-300
- 10 Frazier John M A fish model of animal copper metabolism // Mar Environ Res — 1984 — Vol 14 N 1 — P 478
- 11 Loury G H, Rosebrough H J, Farr A L, Randall R J Protein measurement with Folin phenol reagent // J Biol Chem — 1951 — Vol 193 N 1 — P 265-275
- 12 Marshal A J, Talbot V Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mutilus edulis* X-ray microanalysis and chemical analysis // Chem Biol Interact — 1979 — Vol 27, N 1 — P 111-123
- 13 Tiedemann G, Kuhlbeck M, Rosmanith J Interaction of cadmium and lead in fish // Wiss und Umwelt — 1981 — N 3 — P 145-154
- 14 Wers P, Bogden ID, Englee F C Hg- and Cu- induced hepatocellular changes murchog, *Gardulus heterocephalus* // Environ Health Perspect — 1986 — Vol 65, N 2 — P 167-173
- 15 Windom H L, Smith R G Distribution of iron, magnesium, copper, zinc, silver in oysters along the Georgia Coast // J Fish Res Board Canada — 1972 — Vol 29, N 4 — P 13-15
- 16 Wunder W, Henselike F, Pesch H Die Wirkung von Zink auf die Muskulatur des Sangfishes im Bohlesee // Natur und mus — 1984 — Vol 114, N 4 — P 103-107
- 17 Youson John H, Heville Christine M Deposition of aluminum in the gill epithelium of rainbow trout (*Salmo Gairdneri* Richardson) subjected to sublethal concentration of the metal // Can J Zool — 1987 — Vol 65, N 3 — 647-656

V.O. Khomenchuk

PECULIARITIES OF SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF HEAVY METALS UNDER THE INFLUENCE OF THEIR HIGHER CONCENTRATIONS IN SOME TISSUES OF CARP

The accumulation of heavy metals by the subcellular components depends of the nature of metal, its physiological role in an organism, functional placement of subcells and also on a number of other internal and external factors. A rather high level of accumulation of metals in nuclear fractions of investigated tissues is marked. Outgoing from the definition of toxicity, as an upbuilding of metal in metabolically active patterns, the most toxiferous of the studied metals is copper. The lowest level of accumulation of the investigated metals is characteristic for a nuclear fraction of muscles.

Надійшла 16.03.2001