

УДК 577.352.4: 612.111: 661.84 (597.551.2)

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

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

ТРАНСПОРТ ЙОНІВ ЦИНКУ ТА КАДМІЮ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ РИБ

Досліджено транспорт йонів цинку та кадмію через мембрани еритроцитів коропа, адаптованого до підвищених концентрацій цих металів. Встановлено, що поглинання йонів металів еритроцитами риб є регульованим та дозозалежним процесом. Проникнення йонів металів через клітинну мембрану досліджуваних гідробіонтів здійснюється за допомогою щонайменше двох типів транспорту: високоафінного та низькоафінного.

Ключові слова: короп, еритроцити, транспорт, цинк, кадмії

Характерною особливістю металів є те, що вони не руйнуються в природних умовах, а лише змінюють форму знаходження, поступово накопичуючись в різних компонентах екосистеми. У зв'язку з посиленням антропогенного впливу на природні водні системи особливого значення набуває вивчення впливу йонів металів на метаболічні процеси у гідробіонтів [4]. Роль металів двоюка: з одного боку, вони необхідні для нормального проходження фізіолого-біохімічних процесів, а з іншої - токсичні за підвищених концентрацій [5].

Разом з тим, механізми транспорту металів через біологічні мембрани, особливості їх виведення з організму гідробіонтів, енергетичне забезпечення цих процесів характеризуються складною регуляцією і потребує детальнішого вивчення. Гематологічні показники риб є дуже важливими і інформативними при оцінці стану, як конкретної особини, так і популяції в цілому [9]. Параметри крові прісноводних риб диких популяцій (не трансформованих діяльністю людини) надалі можна використовувати як еталонні норми при оцінці стану інших популяцій. Окрім того, значний інтерес представляє вивчення закономірностей аклімації гідробіонтів до впливу йонів металів, формування толерантності організму гідробіонтів до цих токсикантів та ролі окремих тканин при цьому.

Тому метою роботи стало дослідження транспорту йонів цинку та кадмію через мембрани еритроцитів коропа.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus caprio L.*) з середньою масою 300-350 г. Риб утримували в акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою (вміст O_2 складав $7,5 \pm 0,5$ мг/дм³; CO_2 – $2,5 \pm 0,3$ мг/дм³; рН – $7,8 \pm 0,1$). Риб адаптували до дії $0,05$ і $0,2$ мг/дм³ йонів Zn^{2+} та $0,005$ і $0,02$ мг/дм³ йонів Cd^{2+} , що відповідали їх $0,5$ та $2,0$ рибогосподарським ГДК [1]. Необхідні концентрації йонів металів у воді створювали внесенням солей $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ та $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ кваліфікації "х.ч.". Період аклімації риб становив 14 діб, що є достатнім для формування фізіолого-біохімічної відповіді на дію стресчинника [3].

Після зазначеного терміну у риб голкою з серця відбирали кров. Для запобігання згортання крові до 10 її об'ємів додавали 1 об'єм 0,001 % розчину гепарину. Для отримання еритроцитарної фракції цільну гепаринізовану кров центрифугували 5-10 хвилин при 1000 g. Надосадову рідину видаляли, а еритроцити з осаду два рази промивали трьохкратним об'ємом фізіологічного розчину шляхом центрифугування. Білий шар лейкоцитів над еритроцитами обережно збирали за допомогою тонкої піпетки. Всі процедури проводити при $+4$ °C.

Після цього *in vitro* вивчали концентраційну (0,1, 0,5, 1, 2, 3 та 5 мг/л) залежність проникнення йонів цинку та кадмію в еритроцитах аклімованих та неаклімованих риб. Йони металів вносили у вигляді розчину солей $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ та $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ кваліфікації "х.ч.". Як інкубаційне середовище використано розчин Рінгера для холоднокровних ($NaCl$ - 129,6 мМ, $CaCl_2$ - 1,8 мМ, $NaHCO_3$ - 2,5 мМ, KCl - 2,7 мМ). Співвідношення об'єму крові до об'єму

досліджуваного розчину становило 1:10. Інкубацію (30 хв) здійснювали при температурі 18⁰С в розчині, що був насичений атмосферним киснем. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 0,01 М розчину ЕДТА, після чого еритроцити промивали 3 рази чистим фізіологічним розчином. Рівень накопичення металів визначали як різницю між вмістом металів в контрольній (без додавання йонів токсиканту) та дослідних групах та виражали в мкг/г вологої маси. Для визначення вмісту кадмію та цинку в еритроцитах останні спалювали в перегнаній азотній кислоті у співвідношенні 1:5 (маса: об'єм). Вміст металів визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115.

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

Результати досліджень та їх обговорення

Як показали результати досліджень, поглинання йонів цинку у контрольних груп риб носить відмінний характер порівняно з йонами кадмію (рис. 1.). Відмічено значно більшу кількість сорбованого цинку. Слід також відмітити різний тип кінетичних кривих проникнення йонів металів через мембрани еритроцитів.

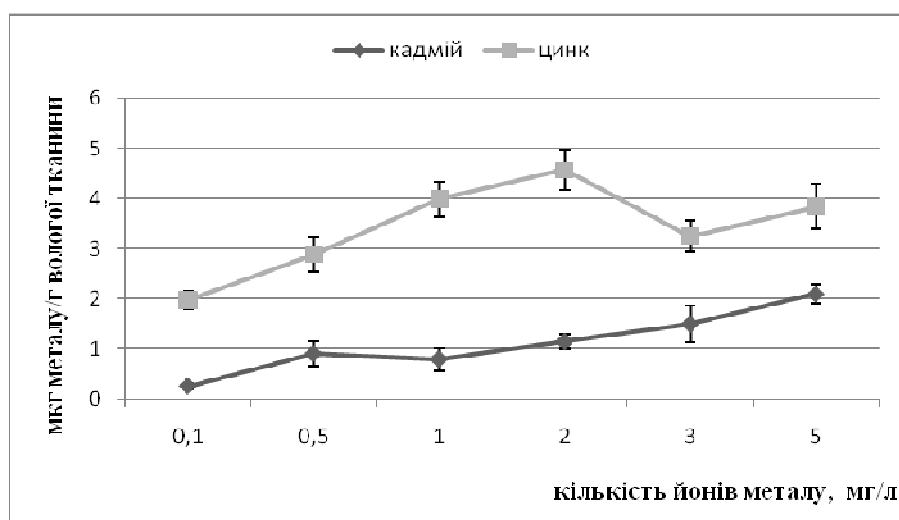


Рис. 1. Поглинання йонів кадмію та цинку еритроцитами коропа контрольної групи

При цьому, можна припустити існування двох механізмів надходження йонів металів через клітинну мембрану. При низьких концентраціях (0,1 - 2 мг/л для Zn^{2+} та 0,1 – 0,5 мг/л для Cd^{2+}) токсикантів в середовищі, очевидно, має місце реалізація регульованого мембраною високоспорідненого транспорту досліджуваних йонів металів, на що вказує ефект насичення.

При подальшому підвищенні концентрації Zn^{2+} (>2 мг/л) та Cd^{2+} (>0,5 мг/л) в середовищі інкубації, надходження йонів цинку та кадмію через мембрану еритроцитів, швидше за все, здійснюється шляхом дифузії або через йонні канали, про що свідчить лінійне зростання кількості сорбованих металів. Відомо, що йони металів взаємодіють з Ca^{2+} -рецепторами фосфатидилінозитидної сигнальної системи, внаслідок чого відкриваються Ca^{2+} -канали, ініціюється вільнорадикальне окиснення під їх впливом та зростає потік токсикантів всередину клітини [8].

Якщо проаналізувати проникнення йонів цинку в адаптованих групах риб, то також можна відмітити подібний їх профіль як за дії допорогової, так і сублетальної концентрації. Разом з тим характер кривої поглинання йонів цинку еритроцитами риб аклімованих до дії 0,5 ГДК Zn^{2+} схожий до такого в неаклімованих риб. За адаптації риб до дії сублетальних концентрацій йонів металу їх резистентність до дії токсиканта значною мірою зростає, порівняно із групою риб адаптованих до дії допорогових концентрацій, про що свідчить зменшення кількості сорбованого металу.

При вивченні кінетики поглинання йонів цинку в риб, аклімованих до 0,5 ГДК йонів металу в діапазоні 0,1-1 мг/л йонів металу, має місце значне зростання кількості сорбованого

металу, після чого його вміст дещо зменшується за концентрації 2 мг/л з подальшим незначним лінійним зростанням кількості металу до 5 мг/л йонів Zn^{2+} в середовищі (рис. 2.).

Таку закономірність кінетики поглинання йонів цинку, ймовірно, можна пояснювати насиченням поверхні еритроцитів, після чого процес накопичення починає лімітуватися іншими факторами, такими як проникнення металу через мембранні структури, швидкістю екскреції. Тобто, при певній концентрації металу в організмі, настає динамічна рівновага між надходженням та виведенням металу. При зростанні кількості Zn^{2+} у інкубаційному середовищі вище 2 мг/л спостерігається лінійна залежність концентрація токсиканту – кількість сорбованого металу, що вказує на проникнення йонів цинку через йонні канали мембрани еритроцитів.

У риб, адаптованих до дії 2 ГДК йонів цинку кількість поглинутого металу є нижчою порівняно з рибами аклімованими до дії допорогових концентрацій (рис. 2.). Сорбція йонів цинку через мембрану еритроцитів аклімованих риб до дії сублетальних кількостей токсиканту у інтервалі концентрацій йонів металу 0,1 – 1 мг/л носить лінійний характер та, очевидно, проходить за допомогою регульованого високоспорідненого транспорту.

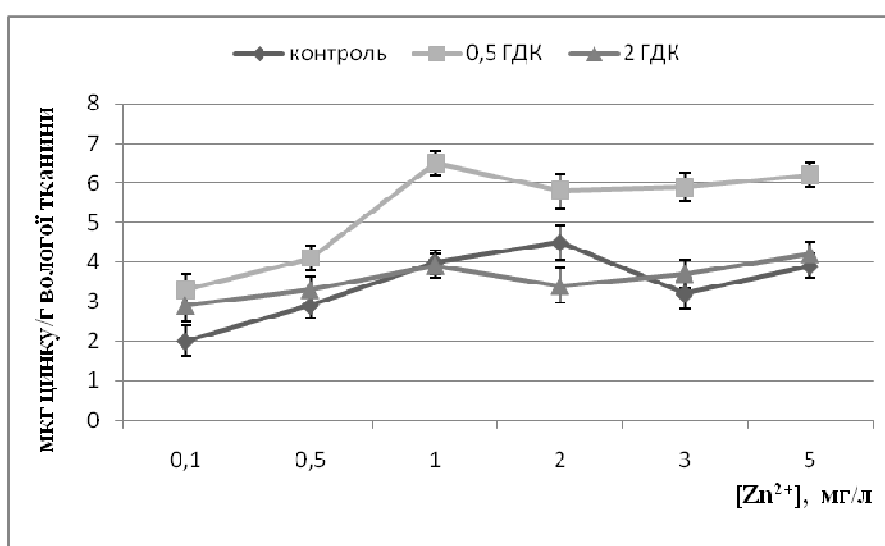


Рис. 2. Вплив аклімації до дії підвищених концентрацій йонів цинку на їх поглинання еритроцитами коропа

При концентрації Zn^{2+} близько 1 мг/л відмічається насичення мембрани еритроцитів з подальшим зменшенням кількості поглинутого металу при концентрації 2 мг/л. У інтервалі концентрацій 2-5 мг/л спостерігається лінійне зростання кількості сорбованого металу у еритроцитах, що вказує на нерегульоване надходження йонів цинку за градієнтом концентрації.

Зменшення кількості накопиченого металу в еритроцитах риб адаптованих до дії 2 ГДК токсиканту, порівняно з показниками риб аклімованих до дії допорогової концентрації, очевидно, є наслідком ущільнення мембрани еритроцитів коропа та значної модуляції її функціональної активності [2].

Отримані дані щодо накопичення йонів кадмію в еритроцитах риб показують, що аклімовані до дії допорогових концентрацій токсиканту риби сорбують більшу його кількість порівняно з контрольною групою, але при цьому спостерігаються різні механізми їх надходження через біомембрану (рис. 3.).

За зростання концентрації йонів Cd^{2+} більше 2 мг/л спостерігається зменшення кількості сорбованого металу еритроцитами риб дослідної групи. Це можна пояснити з однієї сторони інгібуванням мембранних переносників, можливо, за рахунок зв'язування металу з їх $-SH$ групами, адже відомо, що кадмій відноситься до групи, так званих «тіолових отрут» [6], а з іншої – зростанням резистентності мембранних структур та ізолюючої здатності мембрани щодо йонів кадмію.

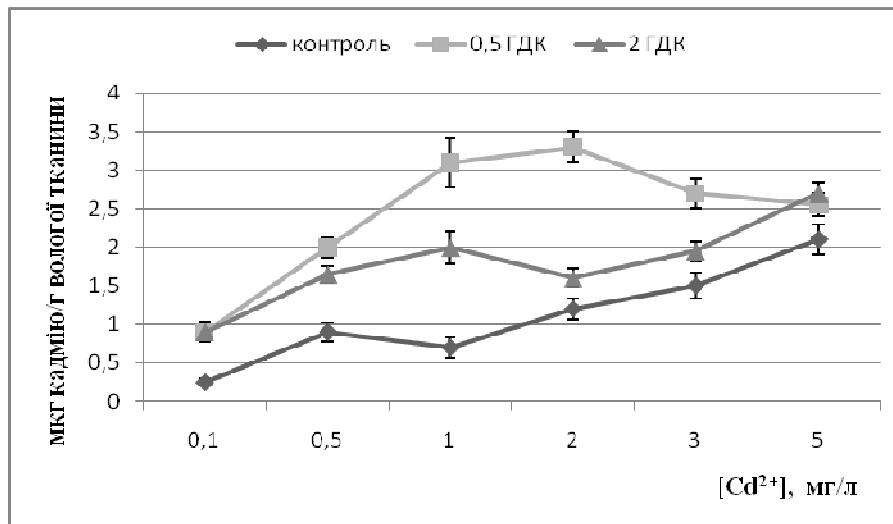


Рис. 3. Вплив аклімації до дії підвищених концентрацій йонів кадмію на їх поглинання еритроцитами коропа

У риб, аклімованих за 2 ГДК йонів кадмію кількість поглинутого металу є нижчою порівняно з рибами адаптованими до дії допорогових концентрацій токсиканту, але вищою порівняно з контрольною групою риб (рис. 3.).

Відмічено лінійний характер накопичення йонів токсиканта з максимумом при 1 та 5 мг/л і мінімумом при концентрації 2 мг/л. У інтервалі концентрацій 0,1-1 мг/л Cd²⁺ спостерігається регульований високоафінний транспорт йонів металу через мембрану еритроцитів. При зростанні концентрації токсиканту вище 2 мг/л відмічається лінійна залежність між концентрацією токсиканту у воді та його кумульованою кількістю у еритроцитах.

Очевидно, сублетальні концентрації Cd²⁺ призводять до значних змін як її ліпідного, так і білкового компонентів мембран еритроцитів. Тому, такий характер кінетики проникнення йонів токсиканту в аклімованих до 2 ГДК риб є результатом значних порушень цілісності мембрани еритроцитів, і, як наслідок, організм не в змозі регулювати та обмежувати надходження йонів кадмію, що і є наслідком нерівномірного його поглинання.

Отже, в загальному слід відмітити, що проникнення йонів металів через еритроцитарну мембрану здійснюється щонайменше двома типами переносників – високо- та низькоафінними, залежно від концентрації йонів Cd²⁺ та Zn²⁺ в середовищі. В роботі [7] було показано, що на відміну від кадмію для біогенних металів, і зокрема для цинку, рівень регуляції їх вмісту в організмі гідробіонтів значно вищий.

Висновки

1. Поглинання йонів кадмію та цинку еритроцитами коропа є регульованим та концентраційнозалежним процесом. Адаптація риб до дії йонів цих металів значною мірою модулює їх проникнення через мембрану червоних кров'яних тілець.
2. Відмічено збільшення кількості поглинутого кадмію еритроцитами коропа, адаптованого до підвищених концентрацій йонів металу, що, очевидно, є наслідком порушення цілісності мембрани за дії Cd²⁺.

1. Беспмятнов Г.П. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник / Г.П. Беспмятнов, Ю.А. Кротов – Л.: Химия, 1985. – 304 с.
2. Патин С.А. Микроэлементы в морских организмах и экосистемах / С.А. Патин, Н.П. Морозов – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 152 с.
3. Сим Э. Биохимия мембран / Э. Сим – М.: Мир, 1985. – 110 с.
4. Хочачка П. Биохимическая акклимация/ П. Хочачка, Дж. Сомеро – М.: Мир, 1988. – 568 с.
5. Crist R.H. Interactions of metals and protons with algae /R.H. Crist, K. Oberholser, D. Schwartz// Environ. Sci. Technol., 1988. – Vol. 22. – P. 755–760.
6. Foulkes E.C. Metallothionein and glutathione as determinants of cellular retention and extrusion of cadmium and mercury /E.C. Foulkes// Life Sci., 1993. – Vol. 52. – P.1617–1620.

7. *Linder M.C.* Biochemistry of Copper /M.C. Linder – N. Y.: Plenum Press, 1991. – P. 161–184.
8. *McGeer J.C.* Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs /J.C. McGeer, C. Szebedinszky, D.G. McDonald// *Aquat. Toxicol.*, 2000. - Vol. 50, № 3. - P. 231–243.
9. *Protasowcki M.* Biochumulacja Cd, Pb, Cu, Zn w karpin – *Cyprinus carpio* L. W zależności od stężenia w wodzie i czasu ekspozycji /M. Protasowcki, A. Chodynieski// *Lesz. Nauk. Rub. Mor. I Technol. Zum. AR Szozecinie.*, 1988. – Vol. 17. – P. 69–84.

Ю.И. Сенюк, Б.З. Ляврин, Ю.В. Синюк, В.А. Хоменчук, В.З. Курант

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка

ТРАНСПОРТ ИОНОВ ЦИНКА И КАДМИЯ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ РИБ

Исследовано транспорт ионов цинка и кадмия через мембраны эритроцитов карпа, адаптированного к действию повышенных концентраций этих металлов. Установлено, что поглощение ионов металлов эритроцитами является регулируемым и дозозависимым процессом. Проникновение ионов металлов через клеточную мембрану исследуемых гидробионтов осуществляется с помощью не менее двух типов транспорта: высокоаффинного и низкоаффинного.

Ключевые слова: карп, эритроциты, транспорт, цинк, кадмий

Yu.I. Senyuk, B.Z. Lyavrin, Yu.V. Synyuk V.A., Khomenchuk, V.Z. Kurant

Volodimir Hnatiuk Ternopil National Pedagogical university, Ukraine

TRANSPORT OF ZINC AND CADMIUM IONS THROUGH THE ERYTHROCYTE MEMBRANE OF FISH

Researched the transport of zinc and cadmium ions through the erythrocyte membrane of carp adapted to the elevated concentrations of those metals. Found that the uptake of metal ions by erythrocytes is regulated and dose-dependent process. The penetration of metal ions through the cell membrane of studied fish performs by two types of transport: a high affinity and low affinity.

Key words: carp, erythrocyte, transport, zinc, cadmium

Рекомендує до друку

Надійшла 24.08.2012

В.В. Грубінко