

УДК 577.125:577.115:57.085:639.215.2:591.543.42

**ВМІСТ ЛІПІДІВ У БІЛИХ М'ЯЗАХ І ЗЯБРАХ КОРОПА
(*CYPRINUS CARPIO L.*) ЗА ГІПОКСИ-ГІПЕРКАПНІЧНОГО ВПЛИВУ**

С. Сисолятін

*Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ 03041, Україна
e-mail: sergiy_sv@ukr.net*

У статті наведено результати дослідження методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії вмісту окремих класів ліпідів у білих м'язах і зябрах коропа за гіпокси-гіперкапнічного впливу за зниження температури середовища (штучний гіпобіоз). Встановлено зменшення вмісту загальних ліпідів і перерозподіл індивідуальних ліпідів у досліджуваних тканинах зі зростанням терміну експозиції. Зростання у тканинах рівня фосфоліпідів і холестеролу, основних структурних компонентів клітинних мембран, ймовірно, пов'язано з модифікацією структури мембран в умовах досліду. Виявлене зниження рівня триацилгліцеролів, а також підвищення кількості неестерифікованих жирних кислот і етерів холестеролу, можливо, спрямоване на забезпечення енергетичного потенціалу організму коропа за гіпокси-гіперкапнічного впливу. Відмічені відмінності для білих м'язів і зябер коропа вмісту окремих класів ліпідів за гіпокси-гіперкапнічного впливу може зумовлюватися їхніми фізіолого-біохімічними і функціональними особливостями. Отримані дані свідчать про залучення ліпідів в енергетичні й адаптаційні процеси за дії гіпобіотичних чинників.

Ключові слова: ліпіди, білі м'язи, зябра, короп, гіпоксія, гіперкапнія

Однією з центральних проблем біології є проблема адаптації до стрес-факторів навколишнього середовища (зниження температури, гіпоксія тощо) завдяки комплексу біохімічних механізмів, які беруть участь у розвитку компенсаторних реакцій організму [2, 13, 14]. У риб у ході еволюції виробились механізми пристосування до впливу стрес-факторів водного середовища на молекулярному, клітинному, біохімічному, фізіологічному, поведінковому та інших рівнях організації. Вивчення фундаментальних основ механізму розвитку стану оберненого пригнічення життєдіяльності організму внаслідок гіпокси-гіперкапнічного впливу за зниження температури, так званий штучний гіпобіоз [5, 11], викликає значний науковий і практичний інтерес.

Формування гіпобіотичного стану як у пойкилотермних, так і у гомойотермних тварин призводить до гіпометаболізму і супроводжується низкою адаптаційних пристосувань за участі ліпідів, що пов'язано з їхньою роллю у сигнальних системах клітин. Крім того, ліпіди, які є пластичним матеріалом клітинних мембран і основним енергетичним джерелом, відіграють провідну роль у функціонуванні та перебігу різноманітних процесів в організмі [1, 15].

Одна з відмінних особливостей метаболізму ліпідів риб полягає у значній амплітуді складу й інтенсивності накопичення ліпідів в організмі, що настають як у результаті ендогенних змін, так і під впливом умов зовнішнього середовища. Модифікація ліпідної складової є компенсаторним механізмом, що забезпечує функціональні можливості організму за різноманітних умов [3, 7, 9, 10]. Виходячи з цього, важливим є дослідження особливос-

тей ліпідного складу зябер як органа, що безпосередньо контактує з водним середовищем, та білих м'язів – як основного місця депонування ліпідів в організмі прісноводних риб.

Метою роботи було дослідити вміст ліпідів і співвідношення їхніх класів у білих м'язах і зябрах коропа української лускатої породи за гіпокси-гіперкапнічного впливу.

Матеріал та методи

Досліди проводили за використання коропа української лускатої породи (*Cyprinus carpio* L.) масою 250–270 г, якого отримували з Іванківського рибокомбінату Київської обл. Рибу відбирали в осінній період і протягом трьох днів утримували в басейні об'ємом 2000 дм³ для адаптації.

Для проведення досліджень було сформовано дві групи: перша – контрольна ($n=5$), риба перебувала в активному стані життєдіяльності, друга – дослідна ($n=5$, для кожного досліджуваного терміну), риба перебувала у стані штучного гіпобіозу (гіпокси-гіперкапнічний вплив за зниження температури середовища), як описано [5]. Після розтину риб першої (контроль) і другої (на 3-тю, 6-ту і 24-ту год експозиції) груп вилучали білі м'язи та зябра. Проводили гомогенізацію тканин і екстракцію ліпідів хлороформ-метаноловою сумішшю методом Фолча [12]. Кількість загальних ліпідів у тканинах визначали ваговим методом після відгонки екстрагуючої суміші [16].

Розділення ліпідів на окремі класи проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії на пластинках розміром 15x15 см із нанесеним на них силікагелем марки «Silufol» (Чехія) [8]. Пластинки з підсушеними плямами ліпідів розташовували в герметично зачинені скляні хроматографічні камери, в яких містилася рухома фаза такого складу: гексан – діетиловий етер – оцтова кислота (90:10:1, об./об.). Після проходження розчинника пластинку підсушували та піддавали дії проявника. Проявник – пари кристалічного йоду, які забарвлювали ліпіди в коричневий колір.

Проявлені плями були ідентифіковані при визначенні R_f [4] і шляхом порівняння з відомими маркерами ліпідів (для фосфоліпідів – *фосфатидилхолін*; для триацилгліцеролів – *трипальмітилгліцерол*; для неестерифікованих жирних кислот – *стеаринова або пальмітинова кислота*; для неестерифікованого холестеролу – *холестерол*, а для естерифікованого холестеролу – *холестерилвалеріанат*) фірм «Reanal» (Угорщина) та «Sigma-Aldrich» (Німеччина). Кількісне визначення загальних фосфоліпідів і триацилгліцеролів проводили за використання гідроксаматного методу; холестеролу та його етерів – колориметричного методу з хлорним залізом; неестерифікованих жирних кислот – колориметричного методу з 1,5-дифенілкарбазидом [6].

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента, з використанням пакетів комп'ютерних програм MS Excel 2016.

Результати і їхнє обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що вміст загальних ліпідів (ЗЛ) у дослідних тканинах коропа зменшується за гіпокси-гіперкапнічного впливу порівняно зі станом активної життєдіяльності.

Зокрема, на 24-ту год експозиції штучного гіпобіозу вміст ЗЛ у білих м'язах коропа знижується на 6,9 % ($P<0,05$), а у зябрах – на 4,8 % ($P<0,05$), порівняно зі станом активної життєдіяльності (див. таблицю).

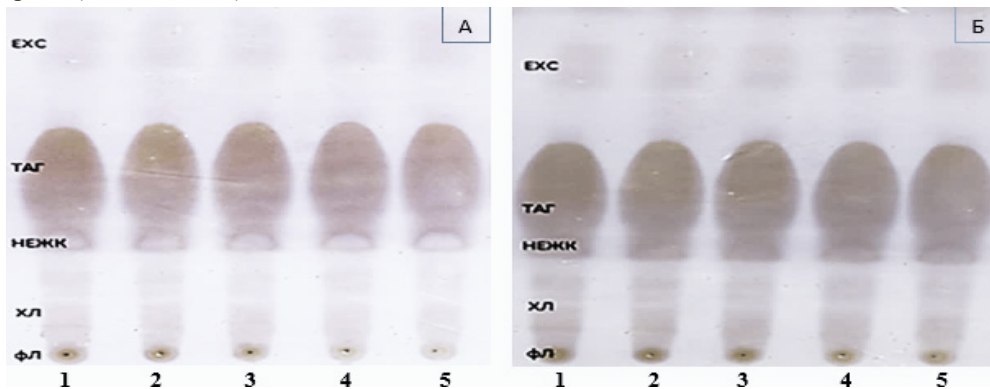
У результаті проведення висхідної одномірної тонкошарової хроматографії загальних ліпідів білих м'язів і зябер коропа виявлено такі ліпіди: триацилгліцероли (ТАГ), неестерифіковані жирні кислоти (НЕЖК), фосфоліпіди (ФЛ), холестерол (ХС) і естерифікований холестерол (ЕХС).

Загальний вміст ліпідів і співвідношення окремих їхніх класів у білих м'язах і зябрах коропа за гіпокси-гіперкапічного впливу, мг/г сирової тканини, (M±m; n=5)

Класи ліпідів	Контроль	Дослід, год експозиції		
		3 год експозиції	6 год експозиції	24 год експозиції
Білі м'язи				
Загальні ліпіди	86,00±2,51	84,60±2,34	83,90±1,21	80,10±2,05*
Триацилгліцероли	12,20±0,79	8,30±0,46*	5,40±0,42*	1,90±0,67*
НЕЖК	10,80±0,46	11,60±0,49	12,30±0,29	13,10±0,50*
Фосфоліпіди	60,20±0,63	61,00±0,67	61,90±0,59	63,30±0,34*
Холестерол	2,00±0,25	2,50±0,13	2,80±0,13*	3,20±0,29*
Етери холестеролу	0,80±0,13	1,20±0,12*	1,50±0,13*	1,80±0,17*
Зябра				
Загальні ліпіди	108,00±0,92	106,80±0,75	105,50±1,25	102,80±1,02*
Триацилгліцероли	17,60±2,09	14,00±2,65*	10,20±1,29*	5,40±1,38*
НЕЖК	11,10±1,13	12,40±0,92	13,10±1,13*	13,70±1,04*
Фосфоліпіди	74,80±3,51	75,20±0,13	76,40±0,22	77,10±0,13
Холестерол	1,50±0,25	1,80±0,29	2,10±0,29*	2,60±0,33*
Етери холестеролу	3,00±0,38	3,40±0,18*	3,70±0,29*	4,00±0,33*

Примітки: НЕЖК – нестерифіковані жирні кислоти; * – P<0,05 щодо контрольної групи

Отримані результати свідчать, що склад ліпідів м'язів і зябер риб у стані активної життєдіяльності та в умовах гіпокси-гіперкапічного впливу (на 3-тню, 6-ту та 24-ту год експозиції) однаковий і складається з полярних та неполярних ліпідних компонентів (див. рисунок). Однак зі зростанням терміну експозиції гіпокси-гіперкапічного впливу спостерігаються зміни кількісного вмісту індивідуальних ліпідів у білих м'язах і зябрах коропа (див. таблицю).



Хроматографічне розділення загальних ліпідів білих м'язів (А) та зябер (Б) коропа: фосфоліпіди (ФЛ), холестерол (ХЛ), нестерифіковані жирні кислоти (НЕЖК), триацилгліцероли (ТАГ) та етерифікований холестерол (ЕХС); 1 – стандартна суміш індивідуальних ліпідів, 2 – контрольна група, 3–5 – дослідні групи (3, 6 та 24 год експозиції штучного гіпобіозу). Типові тонкошарові хроматограми

Встановлено, що за всіх термінів експозиції гіпокси-гіперкапічного впливу в білих м'язах і зябрах коропа спостерігаються особливості змін кількісного вмісту полярних та неполярних ліпідів. Зокрема, на 24-ту год експозиції в білих м'язах і зябрах коропа вміст ХС збільшується в 1,6 разу (P<0,05), у зябрах – 1,7 разу (P<0,05), а вміст ЕХС (основної запасної форми ХС) збільшується у 2,3 разу (P<0,05) та 1,3 разу (P<0,05) відповідно, порівняно зі станом активної життєдіяльності. За гіпокси-гіперкапічного впливу кількісний вміст ФЛ у білих м'язах зростає на 5,2 % (P<0,05), а в зябрах – недостовірно порівняно з коропом

у стані активної життєдіяльності (див. таблицю). Виходячи з того, що основні структурні компоненти клітинних мембран – ФЛ та ХС [3, 7, 10], зростання у дослідних тканинах вмісту ХС, який упорядковує гідрофобну частину мембран, можливо, супроводжується зменшенням плинності мембран і пов'язано з адаптаційними процесами.

Водночас, на 24-ту год експозиції гіпокси-гіперкапічного впливу рівень ТАГ зменшується на 84,4 % ($P < 0,05$) та 69,3 % ($P < 0,05$), а вміст НЕЖК збільшується на 23,4 % ($P < 0,05$) та 21,3 % ($P < 0,05$) в білих м'язах і зябрах коропа відповідно, порівняно зі станом активної життєдіяльності (див. таблицю). Відомо, що ТАГ найбільш варіабельні щодо екзогенного впливу та піддаються гідролізу з утворенням жирних кислот [9].

Результати дослідження свідчать про збільшення швидкості ліполізу, можливо, для забезпечення енергетичного потенціалу організму коропа [15] за гіпокси-гіперкапічного впливу за зниження температури тіла.

Порівняльний аналіз змін вмісту індивідуальних ліпідів у досліджуваних тканинах за гіпокси-гіперкапічного впливу вказує на відмінності, що може зумовлюватись їхніми фізіолого-біохімічними і функціональними особливостями за розвитку адаптаційних можливостей, які спрямовані на підтримання енергетичного гомеостазу. *Отримані дані узгоджуються* з результатами впливу абіотичних і біотичних чинників довкілля на вміст ліпідів у тканинах і органах тварин [3, 7, 9, 15].

Результати досліджень свідчать, що в білих м'язах і зябрах коропа української лускатої породи за дії гіпокси-гіперкапічного середовища спостерігаються зміни вмісту й характер перерозподілу індивідуальних ліпідів, який свідчить про залучення їх в енергетичні й адаптаційні процеси.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Веланский П. В., Костецкий Э. Я. Липиды морских холодноводных рыб // Биология моря. 2008. Т. 34. № 1. С. 53–57.
2. Гулевский А. К., Щеняевский И. И., Релина Л. И. и др. Холодовая адаптация пойкилотермных и гетеротермных животных // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Х., 2012. С. 127–164.
3. Коломийцева И. К. Липиды в гибернации и искусственном гипобиозе млекопитающих (обзор) // Биохимия. 2011. Т. 76. № 12. С. 1604–1614.
4. Куліков А. Ю. Тонкошарова хроматографія: теоретичні основи та практичне використання: навч.-метод. посіб. Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна. 2011. 260 с.
5. Мельничук С. Д., Мельничук Д. О. Гіпобіоз тварин: молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини: монографія. К.: Вид. центр НАУ, 2007. 220 с.
6. Петровский В. И., Регеранд Т. И., Лизенко Е. И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови // Лаб. дело. 1986. № 6. С. 339–343.
7. Попова Е. М., Коцкій І. В. Ліпіди як компонент адаптації риб до екологічного стресу // Рибогосподарська наука України. 2007. № 1. С. 49–56.
8. Рівіс Й. Ф., Федорук Р. С. Кількісні хроматографічні методи визначення ліпідів і жирних кислот у біологічному матеріалі: метод. посіб. Львів: СПОЛОМ, 2010. 109 с.
9. Сисолятин С. В. Ліпідний склад тканин лускатої коропа (*Cyprinus carpio* L.) за умов штучного вуглекислотного гіпобіозу // Рибогосподарська наука України. 2016. № 3(37). С. 111–122.

10. Смирнов Л. П., Богдан В. В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука, 2007. 181 с.
11. Тимофеев Н. Н. Гипобиоз и криобиоз. Прошлое, настоящее, будущее. М.: Информ-Знание, 2005. 256 с.
12. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
13. Guschina L. A., Harwood J. L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Lett. 2006. Vol. 580. N 23. P. 5477–5483.
14. Hochacka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation mechanism and process in physiological evolution // New York, London, Oxford University Press US. 2002. 466 p.
15. Hong H., Zhou Y., Wu H. et al. Lipid content and fatty acid profile of muscle, brain and eyes of seven fresh water fish: a comparative study // J. Am. Oil Chem. Soc. 2014. Vol. 91, N. 5. P. 795–804.
16. Kates M. Techniques of Lipidology: Analysis, isolation and Identification of Lipids. American Elsevier Pub. Co., Inc., New York, N.Y. 1986. P. 163–164.

Стаття: надійшла до редакції 28.04.17

доопрацьована 06.09.17

прийнята до друку 19.09.17

CONTENT OF LIPIDS IN WHITE MUSCLES AND GILLS OF CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.) FOR HYPOXIA AND HYPERCAPNIC

S. Sysolyatin

*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15, Heroyiv Oborony St., Kyiv 03041, Ukraine
e-mail: sergiy_sv@ukr.net*

In the article it is presented the results of the research of the content of certain classes of lipids in white muscles and gills of carp with the ascending TLC method by hypoxia and hypercapnic influence at lower temperature of the environment (artificial hibernation). It is established the decrease of total lipids and redistribution of individual lipids in the studied tissues with the increasing of exposure duration. The increase of phospholipids and cholesterol in tissue levels, the main structural component of cell membranes, is probably connected with the modification of the structure of the membrane in the conditions of experience. It is observed that the decrease of triacylglycerols and increase of the number of nonetherified esters of fatty acids and cholesterol are probably aimed at ensuring of the energy potential of the carp for hypoxia and hypercapnic. The differences in white muscles and gills of carp with content of certain classes of lipids for hypoxia and hypercapnic influence can be determined with their physiological and biochemical and functional features. The obtained data indicate about the involvement of lipids into energy and adaptation processes with the actions of the hibernation factors.

Keywords: lipids, white muscles, gills, carp, hypoxia, hypercapnia