

А. О. Безкоровайний<sup>1,2</sup>, А. Р. Зинь<sup>2</sup>, Н. П. Гарасим<sup>1</sup>, Д. І. Санагурський<sup>1</sup>  
 ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА<sup>1</sup>  
 НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ЕКСПЕРТНО-КРИМІНАЛІСТИЧНИЙ ЦЕНТР  
 ПРИ ГУМВС УКРАЇНИ У ЛЬВІВСЬКІЙ ОБЛАСТІ<sup>2</sup>

## ЛІПІДНИЙ ПРОФІЛЬ ЯЙЦЕКЛІТИНИ В'ЮНА *MISGURNUS FOSSILIS* L.

У статті наведено дані про роль ліпідів у клітинах, в тому числі яйцеклітинах, в'юна, їх вплив на запліднення і ранній розвиток організмів. Описано методи вивчення ліпідного профілю яйцеклітини в'юна *Misgurnus fossilis* L., аналіз отриманих даних за допомогою хромато-мас-спектрометрії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: в'юн, яйцеклітина, ліпідний профіль, мас-спектрометрія.

**ВСТУП.** Ліпідний метаболізм відіграє важливу роль у регуляції шляхів диференціювання клітини. Ліпідний склад яйцеклітини має важливе значення для подальшого розвитку організму, оскільки вони відіграють вагомий роль у злитті мембран сперматозоїда та яйцеклітини, акросомній реакції, впливають на мітогенез (*MAPK-kinase*), проліферацію, диференціацію, міграцію клітин, фолдинг білка, апоптоз [5–9]. Розташування ліпідів у компартментах клітини відповідає за їх функції в міжклітинній та внутрішньоклітинній сигналізації. Ліпіди мембран здатні організовуватись у рафти – маленькі гетерогенні та дуже динамічні ліпідні кластери (10–200 нм), збагачені холестерином і фосфоліпідами, які беруть участь у клітинній компартменталізації.

На прикладі голкошкірих, шпорцевої жаби *Xenopus laevis*, прісноводної риби *Danio rerio*, мишей показано, що вилучення з мембран яйцеклітини холестеролу та фосфоліпідних рафтових компонентів призводить до втрати здатності запліднюватись [6–9].

Метою роботи було дослідження ліпідного складу яйцеклітини в'юна *Misgurnus fossilis* L., яке необхідне для отримання цільового уявлення про метаболічний профіль зародкових організмів, що пов'язано з ускладненням останнього впродовж розвитку зародків.

З'ясування ролі процесу змін ліпідного профілю яйцеклітини дозволить створити ряд нових підходів щодо профілактики, діагностування та лікування різних захворювань, підвищення рівня запліднення різного типу яйцеклітин і покращення якості імплантації зародків.

© А. О. Безкоровайний, А. Р. Зинь, Н. П. Гарасим, Д. І. Санагурський, 2014.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Об'єктом наших досліджень були яйцеклітини прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. В'юн є адекватною тест-системою при дослідженні ряду проблем сучасної біології розвитку, що можна пояснити короткою тривалістю періоду ембріогенезу, легкістю отримання статевих продуктів і відсутністю труднощів в утримуванні цих риб у лабораторних умовах [1, 2, 4].

Для експерименту використовували десять самок в'юна середньою довжиною тіла (19,0±3,0) см, дослідження з якими проводили за загальноприйнятими методиками [1, 3, 4]. Загальне ліпідне екстрагування з яйцеклітин здійснювали відповідно до модифікованої методики Блайя та Даєра [5]. Розділення та ідентифікацію ліпідних компонентів проводили на системі хромато-мас-спектрометрії фірми "Agilent Technologies", яка складається з газового хроматографа 6890N та мас-селективного детектора 5975B. Умови хроматографічного розділення: колонка капілярна HP-5 ms довжиною 30 м і внутрішнім діаметром 0,25 мм; фаза – 0,25 мкм.

Відносний процентний вміст кожного компонента розраховували шляхом порівняння його середньої площі піку із загальною площею. Ідентифікацію продуктів проводили з порівнянням каталогів мас-спектрів Wiley та NIST 2008, за допомогою програми AMDIS.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При проведенні досліджень ми отримали характерні фрагменти, а також молекулярні іони 86, 124, 184, 284 m/z для фосфатидилхоліну (m/z – співвідношення між масою даного іона та числом елементарних зарядів, що він несе).

Гліцероловий хвіст в основному фрагментований до моноацилгліцеролу та діацигліцеролу в діапазоні мас 300–500 m/z. Показано високий процентний вміст фосфатидилхоліну (табл.). Це узгоджується з дослідженнями на *Xenopus leavis* та *Danio rerio* [7, 8] і пояснюється тим, що фосфатидилхолін виступає субстратом для утворення ряду біологічно активних речовин, зокрема фосфатидної кислоти та холіну. Він є прекурсором для синтезу нових фосфоліпідів. Менша кількість фосфатидилетаноламіну (табл.) з характерними іонними піками 124 та 142 m/z і фосфатидилсерину з піками 87, 185 m/z збігається з дослідженнями, проведеними на яйцеклітинах *Danio rerio* [7], що можна пояснити зростанням їх кількості в ранньому ембріогенезі, де вони відіграють важливу роль у поділі клітини та фолдингу білків. Фосфатидилінозитол фрагментацією іонів 241 і 277 m/z характеризує на хроматограмі піки циклічного шестиатомного спирту інозитулу та його похідних фосфоіно-

зитулу. Згідно з літературними даними, фосфатидилінозитол в яйцеклітинах шпорцевої жаби є також у невеликій кількості [8], його вміст зростає протягом часу запліднення. Це пояснюють розщепленням фосфатидилінозитулу в момент запліднення та активацією Ca<sup>2+</sup> [8]. Гліцероловий хвіст в основному фрагментований до моноацилгліцеролу та діацигліцеролу в діапазоні мас 300–500 m/z. Високий вміст діацигліцеролових залишків (табл.) пов'язують з його важливою роллю в процесах злиття мембрани сперматозоїда та яйцеклітини і біосинтезі фосфоліпідів [8, 9]. До складу моноацилгліцеролів та діацигліцеролів входять суміші насичених і ненасичених жирних кислот з довжиною вуглеводневого ланцюга C4-C16. Холестерол – один із важливих ліпідів, є прекурсором у синтезі ряду гормонів і вітаміну D, стабілізує пружність мембрани та модулює її компартментізацію. Він ідентифікувався характерними іонними піками 369 та 386 m/z.

Таблиця – Процентний вміст основних ліпідних компонентів яйцеклітин

№	Ліпідний клас	Вміст, %
1	Моноацигліцериди	22,0
2	Діацигліцериди	32,0
3	Фосфатидилхолін	11,0
4	Фосфатидилетаноламін	4,6
5	Фосфатидилінозитол	2,4
6	Фосфатидилсерин	2,3
7	Лізофосфатидилхолін	0,7
8	Холестерол	25

**ВИСНОВКИ.** Ліпідний профіль яйцеклітини в'юна характеризується високим рівнем фосфатидилхоліну та холестеролу. Виявлено також високий вміст діацигліцеролових залишків в яйцеклітинах в'юна, які відіграють важливу роль у процесах злиття мембрани яйцеклітини та сперматозоїда, стимулювання активності фосфоліпази. Вони є важливими

метаболітами в процесах біосинтезу фосфоліпідів. Вивчення ліпідних профілів яйцеклітин та, в подальшому, зародків на ранніх етапах розвитку дозволить розробити нові аналітичні методи дослідження молекулярних процесів раннього ембріогенезу та покращення запліднення різного типу яйцеклітин.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гойда Е. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных / Е. А. Гойда. – К. : Наук. думка, 1993. – 224 с.
2. Зинь А. Р. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз і мембранний транспорт у живих організмах / А. Р. Зинь // Вісник Львівського ун-ту. Серія біол. – 2012. – Вип. 60. – С. 21–39.
3. Нейфах А. А. Молекулярная биология процессов развития / А. А. Нейфах. – М. : Наука, 1977. – 311 с.

4. Санагурський Д. І. Об'єкти біофізики : монографія / Д. І. Санагурський. – Львів : ЛНУ ім. Івана Франка, 2008. – 522 с.
5. A rapid method of total lipid extraction and purification / E. C. Bligh, W. J. Dyer // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – **37**. – P. 913 – 917.
6. Lipid Rafts: Keys to Sperm Maturation, Fertilization, and Early Embryogenesis / N. Kawano, K. Yoshida,

K. Miyado [et al.] // Journal of Lipids. – 2011. – **125**. – P. 10–15.

7. Metabolomics of develop in zebrafish embryos using gas chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry / S.-M. Huang, F. Xua, S. H. Lamb [et al.] // Mol. Biosyst. – 2013. – **9**. – P. 1372–1380.

8. Petcoff D. W. Lipid levels in sperm, eggs, and during fertilization in *Xenopus laevis* / D. W. Petcoff, W. L. Holland, B. J. Stith // Journal of Lipid Research. – 2008. – **49**. – P. 2365–2378.

9. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry / Ferreira C. R., Saraiva S. A., Catharino R. R. [et al.] // J. Lipid Res. – 2010. – **51**. – P. 1218–1227.

**А. О. Безкоровайный<sup>1,2</sup>, А. Р. Зынь<sup>2</sup>, Н. П. Гарасим<sup>1</sup>, Д. И. Санагурский<sup>1</sup>**  
*ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО<sup>1</sup>*  
*НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЭКСПЕРТНО-КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР*  
*ПРИ ГУМВД УКРАИНЫ ВО ЛьВОВСКОЙ ОБЛАСТИ<sup>2</sup>*

## **ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ ЯЙЦЕКЛЕТКИ ВЬЮНА *MISGURNUS FOSSILIS* L.**

### **Резюме**

*В статье приведены данные о роли липидов в клетках, в том числе яйцеклетках, вьюна, их влиянии на оплодотворение и раннее развитие организмов. Описаны методы изучения липидного профиля яйцеклетки вьюна *Misgurnus fossilis* L., анализ полученных данных с помощью хромато-масс-спектрометрии.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** вьюн, яйцеклетка, липидный профиль, масс-спектрометрия.

**A. O. Bezkorovayny<sup>1,2</sup>, A. R. Zyn<sup>2</sup>, N. P. Harasym<sup>1</sup>, D. I. Sanahursky<sup>1</sup>**  
*IVAN FRANKO LVIV NATIONAL UNIVERSITY<sup>1</sup>*  
*SCIENCE AND RESEARCH FORENSIC EXPERT CENTER AT THE MINISTRY OF INTERNAL AFFAIRS OF*  
*UKRAINE IN LVIV REGION<sup>2</sup>*

## **LIPID LEVEL OF LOACH *MISGURNUS FOSSILIS* L. EGG**

### **Summary**

*The article presents data on the lipids role in cells including eggs loach, their effects on fertilization and early development of organisms. Methods for lipids studding loach *Misgurnus fossilis* L.egg, analysis of the data using chromatography-mass spectrometry.*

**KEY WORDS:** loach, egg, lipid level, mass spectrometry.

Отримано 08.07.14

**Адреса для листування:** А. О. Безкоровайний, Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Університетська, 1, Львів, 79000, Україна.