Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

PRIMJENA METODE HROMATOGRAFSKE IDENTIFIKACIJE LIPIDNIH KOMPONENATA TKIVA U EKOTOKSIKOLOGIJI

KOVILJKA STOJKOV
Institut za fiziologiju i biohemiju »Dr Aleksandar Sabovljev« Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 612:597(497.15)

Apstrakt. Metodom tankoslojne hromatografije na Silica gelu (G) razvijene su komponente neuaralnih lipida i fosfolipida iz ekstrakata slatkovodnih riba radi korišćenja rezultata u rješavanju taksonomskog statusa vrsta koje pripadaju slivovima rijeka Bosne i Hercegovine.

Pored kvantitativne analize, spektrofotometrijskim metodama vršena je i kvantitativna denzitometrijska analiza preko fotografske folije, kao i kvalitativna analiza hromatograma neutralnih lipida i fosfolipida. Identificirane su slijedeće frakcije neutralnih lipida: mono- i digliceridi, holesterol, slobodne masne kiseline i trigliceridi, a od fosfolipidnih frakcije: lizolecitin, lecitin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i neidentificirane frakcije označene kao »artefakt« koje imaju tkivno-specifične karakteristike.

Ključne riječi: riba, tkivo, ekstrakt, hromatografija, neutralni lipidi, fosfolipidi, frakcije.

UVOD

Tehnika tankoslojne hromatografije na Silica gelu intenzivnije se koristi od 1956. g., kada je Egon Stahl uveo jednostavan način pripreme tankog sloja Silica gela na staklenim pločama. Ova tehnika je posebno pogodna za kvalitativnu analizu lipidnih frakcija u biološkom materijalu. Robinson i Phillips (1963) pokazali su da se može razdvojiti do deset i više frakcija fosfolipida ovom tehnikom, ali je kvantitativna analiza predstavljala veći problem. Naša metoda tretira i kvantitativnu analizu lipidnih frakcija hromatograma.

Kvantitativnu analizu frakcija tehnikom eluiranja frakcija, razvijanjem boje i fotometriranjem, radili su Robinson i Phillips (1963), Kahovcova i Odavić (1969), Tore et al. (1972). Denzitometrijsku metodu analiziranja hromatograma, koristili su Blond et al. (1971), Wirlund et al. (1972), Wagstaff et al. (1974) i Giridhar et al. (1974). U rutinskom i istraživačkom radu primjenjuju se često obje metode, Hojnacki i Smith (1974). Naša metoda denzitometrije sastoji se u fotografisanju hromatograma sa razvijenim lipidnim frakcijama, a zatim u razvijanju snimka na transparentnoj foliji i

potom denzitometriranje frakcija u denzitometru sa propusnom svjetlosti (Jadrić S., Stojkov K., et al., 1977). Relativni odnosi koncentracija pojedinih frakcija lipida izračunati su na osnovu ekstinkcionih vrijednosti pojedinih frakcija i ukupne sume svih frakcija.

MATERIJAL I METODE

Materijal za analize su bili uzorci tkiva slatkovodnih riba iz slivova rijeka Bosne i Hercegovine. Korišteni su uzorci: srca, bubrega, jetre, slezene, skeletnog mišića i crijeva, a ribe su pripadale vrstama: Ctenopharyngodon idella, Cyprinus carpio, Barbus barbus, Salmo trutta, Leuciscus svallize i Leuciscus cephalus.

Uzorci od po jednog grama svakog organa homogenizirani su u smjesi hloroforma i metanola u odnosu 2:1 (v/v); homogenat je filtriran, evaporiran do suhog lipidnog ostatka, a ovaj potom rastvoren u određenoj količini hloroforma — hloroformski ekstrakt (Odavić R., 1964).

Za određivanje ukupne količine lipida koristili smo metodu Zöllnera i Kircha (1962), za ukupni holesterol metodu McIntera i Ralstona (1954), a za ukupne fosfolipide metodu Berenbluma i Chaina (1938), modificiranu od Longa (1953). Koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina dobijali smo iz prethodnih podataka matematičkim putem.

Metoda tankoslojne hromatografije rađena je na staklenim pločama 20 x 20, firme DESAGA u debljini sloja Silica gela od 0,5 mm i aktiviranim pločama na 115°C 30 minuta. Hloroformski ekstrakt je apliciran u količini od 10—20 mikrolitara u vidu linije (E. Stahl 1958, Mangold, 1974).

Jednodimenzionalna uzlazna hromatografija neutralnih lipida vršena je u komorama (kadama) 30 minuta na + 4°C, uz upotrebu standarda i solventa u sastavu: petroleter; ledena octna kiselina; eter u odnosu 85:1:15 (v/v). Fosfolipidne frakcije hromatografisane su u kadama na sobnoj temperaturi u trajanju od 55 minuta, uz upotrebu standarda i solventa slijedećeg sastava: hloroform; metanol; voda u odnosu 65:25:4 (v/v).

Vizuelizacija frakcija rađena je 50% sulfatnom kiselinom, a identifikacija frakcija prema standardima i R_f vrijednošću pojedine frakcije. Hromatogram je fotografisan a pozitiv razvijen na transparentnoj fotografskoj foliji i denzitometriran u Beckmanovom denzitometru bez filtera. Registrovana krivulja je analizirana tako da su sabrane sve dobijene ekstinkcione vrijednosti za svaku frakciju i na osnovu tih vrijednosti izračunate relativne koncentracije pojedinih frakcija.

REZULTATI I DISKUSIJA

U tabeli 1 prikazani su rasponi vrijednosti od najniže do najviše (u mg/gram) koncentracije za ukupne lipide, holesterol, fosfolipide trigliceride i slobodne masne kiseline. Rezultati se odnose na ekstrakte

tkiva riba iz familije Cyprinidae. Izražena je dobro pravilnost u zastupljenosti ukupnih lipida i pojedinih frakcija. Najveća koncentracija lipida uočava se u ekstraktima crijeva i jetre, a najmanja u srčanom i skeletnom mišiću, što je i očekivano s obzirom metaboličke uloge ovih organa.

Tabela 1. RASPON VRIJEDNOSTI KONCENTRACIJA LIPIDNIH FRAKCIJA IZ TKIVA RIBA PREDSTAVNIKA PORODICE CYPRINIDAE (mg/gr)

Tkivo	ukupni lipidi	holesterol	fosfolipidi	trigliceridi i masne kiseline
Skeletni mišić	13,42— 24,45	1,42— 3,46	2,07— 6,23	6,60—16,16
Srce	7,98— 20,17	1,63— 3,79	1,35— 4,00	4,15 12,70
Jetra	24,14—105,64	6,13—27,01	3,28—21,47	14,73—74,44
Crijevo	63,07—113,31	4,67—15,17	2,81— 8,31	52,59—89,83
Bubreg	14,49— 30,69	3,31— 8,28	2,77— 8,14	8,53—16,83
Slezena	17,08— 28,27	4,14— 7,12	4,55— 7,91	6,10—17,12

Rezultati prikazani u tabeli 1 potvrđuju zapažanja drugih autora da postoje razlike u sadržaju lipidnih frakcija u istim tkivima različitih vrsta, kao i u različitim tkivima istih vrsta i u kvalitativnom i kvantitativnom odnosu (Torpe, 1970; Harper, 1973; Nikolić, 1975; Stojkov i Brkić, 1975). Istraživanja provedena na drugim životinjskim vrstama također pokazuju prisustvo izrazitih razlika u lipidnom sastavu. Dok su kod jednih (kunić, pacov) 50% lipidnog sastava neutralni lipidi (Rooney et al., 1974; Tochima i Akino, 1972), kod drugih su pretežno prisutne fosfolipidne komponente (Hunter et al., 1973; Harper, 1973).

Dalja analiza neutralnih lipida vršena je denzitometriranjem hromatograma sa razdvojenim frakcijama preko transparentne folije u Beckmanovom denzitometru.

Tabela 2. RELETIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD CTENOPHARYNGODON IDELLA

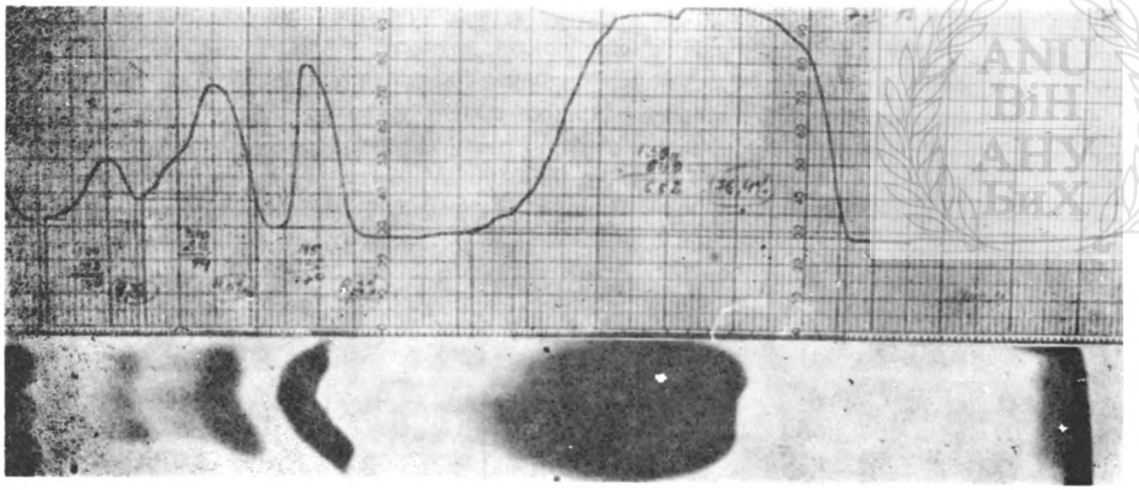
Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	27,8	20,0	42,1	trag
Bubreg	60,4	17,4	19,3	2,7
Jetra	84,2	5,4	8,5	1,7
Slezena	70,8	6,5	20,4	2,2
Skeletni mišić	77,8	6,6	14,1	1,9
Crijevo	80,0	7,9	9,8	2,1

U tabeli 2 prikazani su rezultati kvantitativne denzitometrijske analize hromatograma neutralnih lipida iz tkiva (srce, bubreg, jetra, slezena, skeletni mišić i crijevo) ribe Ctenopharyngodon idella. Dobijene

su frakcije mono i digliceride kao jedna frakcija, holesterol masne kiseline i trigliceridi, posmatrano od starta prema frontu, kako je i prikazano na slici 1, zajedno sa načinom denzitometriranja. Frakcije mono i digliceride su u vrlo malim koncentracijama od pojave »traga«, koji nije mogao da se denzitometrira do relativne koncentracije od 2,2%. Frakcija triglicerida je bila uvijek prisutna u ispitivanim tkivima i njena relativna koncentracija je vrlo visoka u jetri i crijevu, od 84,2—80,0%.

Tabela 3. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD CYPRINUS CARPIO

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	36,1	21,7	40,7	1,5
Bubreg	56,7	19,4	20,0	3,9
Jetra	79,2	7,6	10,1	3,1
Slezena	74,3	6,7	17,4	1,6
Skeletni mišić	72,2	8,3	15,2	4,3
Crijevo	78,6	6,8	10,4	4,2



Slika 1.

U tabeli 3 dati su rezultati denzitometrijske analize dobijene iz istih tkiva kod ribe Cyprinus carpio, gdje je mogla da se dobije koncentracija za mono i digliceride u svim organima. Vrijednosti su kod ove vrste nešto veće, do 4,3% i 4,2% u skeletnom mišiću i crijevu. Trigliceridi su i kod ove vrste najzastupljeniji u crijevu i jetri, a najmanja koncentracijaje nađena u srcu.

Tabela 4 sadrži rezultate dobijene u ekstraktima tkiva Barbus barbus, gdje se zapaža nešto veća koncentracija masnih kiselina nego kod prethodnih vrsta u svim organima izuzev jetre i slezene.

Tabela 4. RELITIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD BARBUS BARBUS

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	47,5	22,5	25,1	4,9
Bubreg	48,6	31,5	16,7	3,2
Jetra	80,1	6,2	10,0	2,7
Slezena	75,1	6,5	16,2	2,2
Skeletni mišić	72,0	14,1	13,1	0,8
Crijevo	75,0	11,1	10,0	3,9

Tabela 5. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD SALMO TRUTTA

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	46,8	22,1	30,9	0,2
Bubreg	51,2	23,2	21,8	3,8
Jetra	38,4	42,8	17,2	1,6
Slezena	56,6	22,2	17,6	4,1
Skeletni mišić	50,6	28,2	21,0	0,8
Crijevo	65,7	15,7	14,4	4,0

U tabeli 5 su dati rezultati frakcija neutralnih lipida iz tkiva Salmo truta. Pored uobičajeno visokih vrijednosti za trigliceride, uočava se veća koncentracija masnih tkiva i vrlo male vrijednosti mono i diglicerida.

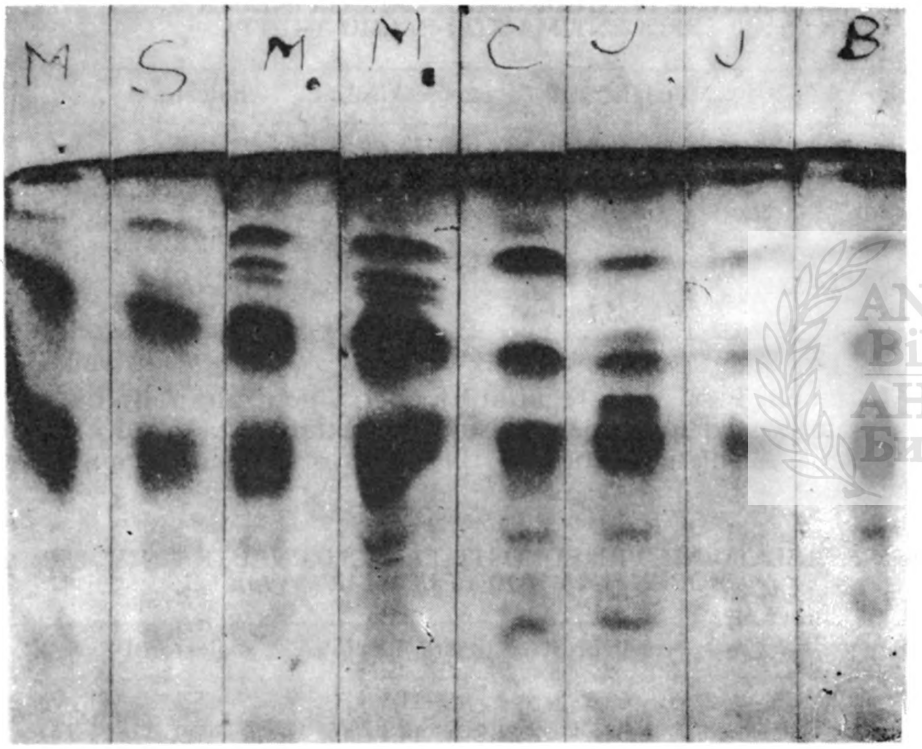
Tabela 6. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD LEUCISCUS SVALLIZE

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	69,8	11,1	15,7	3,4
Bubreg	65,2	14,4	17,9	2,5
Jetra	74,2	11,1	10,7	4,0
Slezena	55,6	20,1	15,4	8,9
Skeletni mišić	73,3	15,1	11,6	trag
Crijevo	69,1	20,8	8,0	2,1

U tabeli 6 prikazani su rezultati denzitometrijske analize neutralnih lipidnih frakcija dobijenih iz ekstrakata tkiva Leuciscus svallize. Izrazito je velika koncentracija triglicerida u srcu ove vrste, dok je koncentracija holesterola približno ujednačena u ispitivanim tkivima, što se primjećuje i kod Leuciscus cephalus-a u tabeli broj 7, sa izuzetkom rezultata iz ekstrakta crijeva i kod jedne i druge vrste.

Tabela 7. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD LEUCISCUS CEPHALUS

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	62,5	17,9	19,5	trag
Bubreg	64,2	16,6	16,7	2,5
Jetra	59,1	21,8	13,5	5,4
Slezena	62,6	19,3	15,9	2,2
Skeletni mišić	83,4	3,5	12,9	trag
Crijevo	75,9	14,3	5,9	3,7



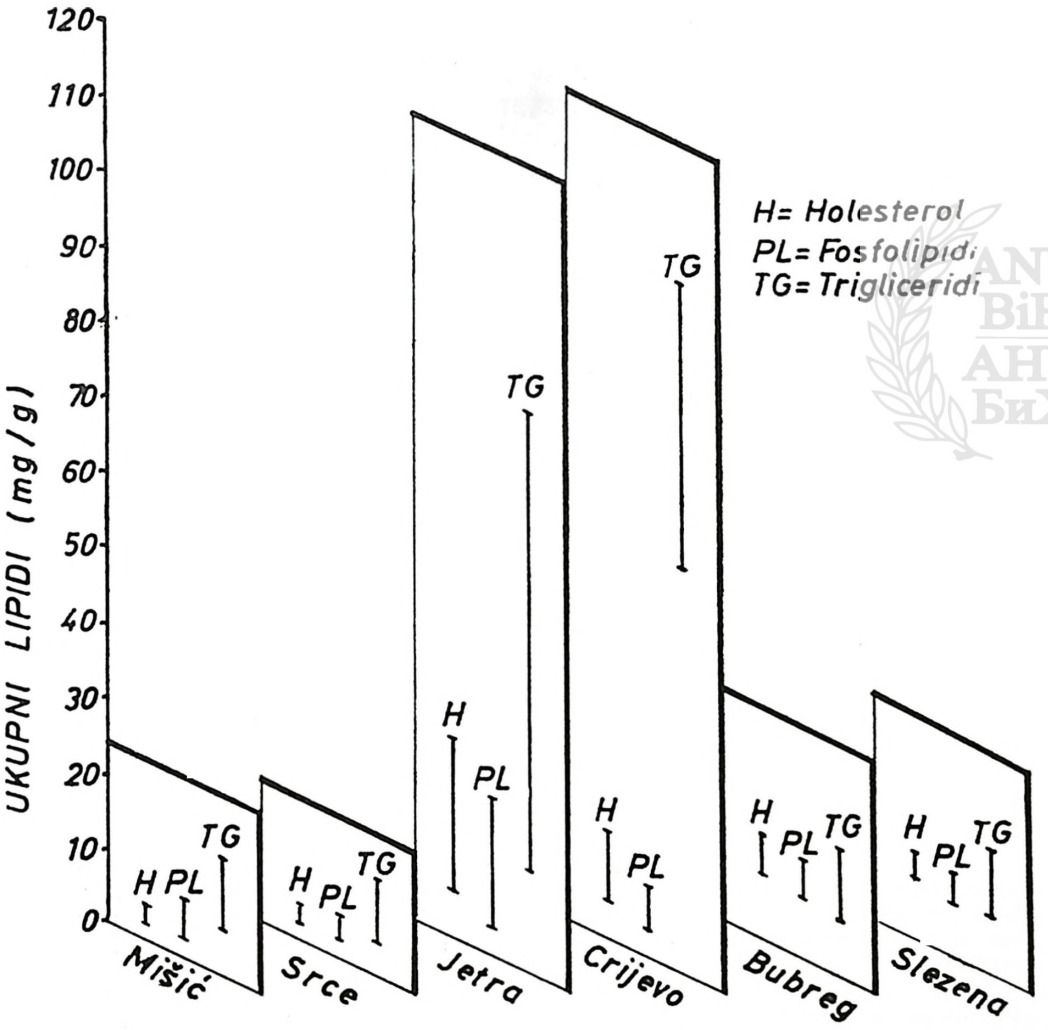
Slika 2.

Kvalitativna analiza hromatograma fosfolipidnih frakcija prikazana je na slici 2.

Hromatogram fosfolipida iz istih tkiva kao riba pokazuje od starta prema frontu frakcije lizolecitina sfingomijelina, lecitina fosfatidilserina i fosfat idiletanolamina i još najmanje 2—3 neidentificirane frakcije. Činjenica je da ribe žive u vodenoj sredini i da su samim tim bespomoćna živa bića u suprotstavljanju ekološkim toksinima. Smatra se da ekologija ima posljedice ne samo na njihove morfološke, kariološke, histološke i dr. promjene već i na biohemijske i fiziološke karakteris-

tike vrste. Upravo su ispitivane lipidne materije, jedne od najpodložnijih, ako ne i najpodložnije organske materije u sastavu živih bića, uticajima ekotoksina. Upravo se na ovim lipidnim komponentama in vivo i in vitro mogu sprovoditi oksidacije ili autooksidacije, čiji su produkti poznati kao: peroksidi, aldehidi, ketoni, ozoni, oksidovane masne kiseline.

Pri oksidacijama na fosfatidnim frakcijama (fosfatidiletanolamin, fosfatidilholin) nastaju, naročito u jetri, lipoperoksidi, koji vrlo brzo povećavaju nivo hidro i alkil peroksida u zavisnosti od prisutnih ekozagađivača. O ulozi fosfolipidnih komponenata u strukturi i funkciji ćelijske membrane živih bića odavno se zna, ali uticaj sredine baš kod riba na fosfolipide još u potpunosti nije ispitan.



Grafikon 1. Odnos pojedinih frakcija holesterola, fosfolipida i triglicerida

ZAKLJUČCI:

U radu je korištena klasična kvantitativna spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih lipida, holesterola, fosfolipida, triglicerida i slobodnih masnih kiselina. Pored toga korištena je metoda tankoslojne hromatografije i njena denzitometrijska analiza preko transparentne folije za dobijanje relativnih koncentracija frakcija neutralnih lipida (Jadrić, S., Stojkov, K. et al., 1977).

Od frakcija neutralnih lipida identificirane su skoro u svim ispitivanim tkivima frakcije: mono- i diglicerida, holesterola, masnih kiselina i triglicerida. Najveću relativnu koncentraciju imala je frakcija triglicerida, a najmanju frakcija mono- i diglicerida, koja nije prelazila vrijednost od 9%, a u nekim tkivima je bila prisutna samo u tragovima. Odnos holesterola prema koncentracijama triglicerida i masnih kiselina, upoređen sa podacima dobijenim kvantitativnim putem, pokazuje slaganje u granicama pogreške jedne i druge metode. Ovo nam pokazuje da se tankoslojna hromatografija na ovaj način može uspješno primjeniti za kvantitativnu analizu lipida, pa i u njima prisutnih toksina. Slične rezultate dobili su istraživači na drugim vrstama: kao u pogledu različitih koncentracija po organima tako i po vrstama (Sanina i Epshtein, 1972; Bruce, 1974; Kunc i Rumpl, 1972).

Kvalitativna analiza hromatograma fosfolipida (sl. 2) pokazala je da količinski preovladava frakcija fosfatidiletanolamina i fosfatidilholina u poređenju sa ostalim frakcijama fosfolipida iz tkiva riba, što su našli i drugi autori (Kreps, 1956, 1967; Smirnov, 1970; Bottino et al., 1967; De Koning, 1968; Galli, Fumagalli, 1968).

Prisustvo »atrefakata« na hromatogramima ekstrakata tkiva ispitivanih ribljih vrsta iz slivova rijeka BiH, po našoj pretpostavci, su posljedica življenja u neodgovarajućoj i zagađenoj okolini. Ispitivanja uticaja ekosredine na lipidne materije organa živih bića zahtjeva, pored velikih materijalnih izdataka, i dugoročna seriozna i udružena ispitivanja (istraživanja).

APPLICATION OF THE METHOD OF CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF LIPID COMPOMENTS OF TISSUE IN ECOTOXICOLOGY

Summary

In the work we tried to describe the method of detection and quantitative chromatogram analysis of neutral lipids extracted from different tissue extracts obtained from 6 types of fishes. This technique can be applied for the identitication and characterization of lipid tissue components in the species exposed to ecotoxine.

The method of detection and chromatogram analysis involves detection on photo-material, densitometry. The results of quantitative analysis of neutral lipids which are presented in 6 tables show a high degree of reproducibility and are compatible with those obtained with classical analytical and quantitative methods.

Qualitative analysis of phospholipids showed that phosphatidylcholin and phosphatidyl ethanolamin represent the types of lipids which dominate in all the thypes of tissues.

This corelates well with Smirnov's (1970) and Femagalli's (1976) results that also detected same tissue types in the fishes of different sorts.

LITERATURA

Blond, J. P., Lemarchal, P., Le Breton, E. (1971): *Determination densitometrique des phospholipides apres chromatographie en couche mince et revelation sulfamolybdique,* Biochimie 53, 1221—1230.

Bondarenko, B. N. (1973): *Quantitative Determination of Lipids by Thin Layer Chromatography,* Voprosy Medicinskoj himiji 19, 438—442.

Berenblum, I., Chain, E. (1938): *An Improved Method for the Colorimatric Determination of Phosphate,* Biochem. J. 32, 295—301.

Bottino, Nestor R., Jeffrey, Lela M., Reiser, Raymond (1967): *The Lipids Antractic Fish,* Antarct. J. U. S. 2, 5.

Bruce, A. (1974): *Skeletal Muscle Lipids. II.: Changes in Phospholipid Composition in Man from Foetal to Middle Age,* J. Lipid Res. 15, 103—108.

Giridhar, V., Dalah, F. R., Winsten, S. (1974): *Molibdenum Blue Reagent Used in Determination of the Lecithin (Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid)* Clin. Chem. 20, 513—519.

Harper, H. A. (1973): *Review of Physioloigcal Chemistry;* Lange, Los Altos.

Hojnacki, J. L., Smith, S. C. (1974): *Separtion of Six Lipid Classes on one Thin Layer Chromatogram,* J. Chromatography 90, 365—370.

Kahovcova, J., Odavić, R. (1969): *A simple Method for the Quantitative Analysis of Phospholipids Separated of Serum Lipids by a Simple TLC Charring Method,* Clin. Chim. Acta 46, 63—67.

Mangold, H. K. (1974): *Thin Layer Chromatography,* »Clinical Biochemistry«, Vol. I, str. 13.

Robinson, N., Phillips, D. M. (1963): *Quantitative Thin Layer Chromatography of Serum Phospholipids,* Clin. Chim. Acta. 8, 385—392.

Sanina, O. I., Epshtein, S. F. (1972): *Study of Phospholipids in Skeletal Muscle Nuclei in Normal State and During Distrophy,* Ukr. Biohim. Žurnal. 44, 740—746.

Torres, J. F., Jodos, D. C., De Fregosi, R. V. (1971): *Determination de las fracciones lipidcas sericas po microcromatografia en capa delgada,* Rev-Assoc. Bioquimicas. Argent. 36, 136—140.

Toshima, N., Akino, T. (1972): *Alveolar and Tissue Phospholipids of Rat Lung,* Tohoku J. Exp. Med. 108, 253—259.

Wagstaff, T., Whyley, G. A., Freedman, G. (1974): *The Measurement of the Lecithin,* Ann. Clin. Biochem. 11, 24—28.

Zöllner, N., Kirch, K. (1962): *Ueber die quantitative Bestimung von Lipoidem (Mikrometode),* Z. Ges-Exp. Med. 135, 545—562.

Yeung, S. K. F., Kiskis, A. (1974): *Molecular Species of Ethanolamine Phosphatides of Dog and Pig Kidney,* Canad. J. Biochem, 52, 830—838.

ANU BiH