

**ФУНКЦІЇ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ТА СИСТЕМИ  
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ЗА ДІЇ  
Co- ТА Zn-ВМІСНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ НА КАРАСЯ  
СРІБЛЯСТОГО (*Carassius auratus gibelio*)**

Г. І. ФАЛЬФУШИНСЬКА<sup>1,2</sup>, Л. Л. ГНАТИШИНА<sup>1</sup>, О. О. ТУРТА<sup>1</sup>, О. Б. СТОЛЯР<sup>1</sup>,  
Н. Є. МІТІНА<sup>3</sup>, О. С. ЗАІЧЕНКО<sup>3</sup>, Р. С. СТОЙКА<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна;

<sup>2</sup>Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського, Україна;  
e-mail: halynka.f@gmail.com;

<sup>3</sup>Національний університет «Львівська політехніка», Україна;

<sup>4</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів

Досліджено вплив наноконкомпозитів кобальту та цинку (Co- та Zn-НК відповідно), синтезованих на основі вінілпіролідону, на металодепонувальні протеїни з антиоксидантним потенціалом – металотіонеїни (МТ) карася сріблястого (*Carassius auratus gibelio*). Протягом 14 діб в акваріуми, де знаходилися різні групи риб, додавали  $Co^{2+}$  (50 мкг/л),  $Zn^{2+}$  (100 мкг/л), Co-НК (833 мкг/л) та Zn-НК (883 мкг/л) або полімерну складову (ПС, 783 мкг/л). Встановлено, що реакція МТ є високоспецифічною до металу, як у вигляді іонів, так і у вигляді їхніх металовмісних наноконкомпозитів (Me-НК):  $Co^{2+}$  і Co-НК збільшують загальний вміст МТ (МТ-SH) і активують систему антиоксидантного захисту, а  $Zn^{2+}$  і Zn-НК – зменшують вміст МТ-SH і пригнічують антиоксидантний захист. Усі форми досліджуваних металів зменшують вміст імунореактивної хелатованої форми МТ (МТi) та відновленого глутатіону, активацію анаеробного обміну, Mn-супероксиддисмутази, а також знижують вміст продуктів окисної деструкції протеїнів і ліпідів у тканині печінки, що супроводжується збільшенням кількості еритроцитів із ядерними аномаліями, проте не зменшують холінестеразну активність. Показано, що співвідношення концентрацій МТ-SH і МТi, антиоксидантний потенціал МТ залежить від вмісту його апоформи. Одержані дані вказують на те, що у карася відбувається часткова біодеградація Me-НК.

*Ключові слова:* металовмісні наноконкомпозити, кобальт, цинк, металотіонеїни, карась сріблястий, антиоксидантний захист, генотоксичність.

Металовмісні наноконкомпозити (Me-НК) стали невід'ємною складовою цілого ряду інноваційних технологій. Водночас, все реальнішою стає небезпека для біоти внаслідок реакційної здатності цих сполук і продуктів їхньої біодеградації. Проте оцінка Me-НК ускладнюється недостатністю методів дослідження екотоксичності нових матеріалів. Здебільшого вивчаються неспецифічні прояви їхньої дії на лініях клітин ссавців, що не забезпечує об'єктивної оцінки їх біоризиків [1].

Прояви токсичності Me-НК переважно пов'язують із впливом іонів металів, що вивільнюються за умов біодеградації Me-НК у клітинах чи позаклітинному середовищі [2, 3]. Проте під час порівняння стану металотіонеїнів (МТ), антиоксидантного захисту, системи біотрансформації та ознак гено- і цитотоксичності в тканинах двостулкового молюска нами було виявлено принципову відмінність у відповіді на дію  $Co^{2+}$  і

Co-НК [4, 5]. Тому було важливим з'ясувати здатність інших біоіндикаторних організмів до утилізації Me-НК. Карась сріблястий (*Carassius auratus gibelio*) становить інтерес як тест-об'єкт, оскільки він є досить толерантним до умов існування, має унікальні морфологічні і біохімічні пристосування до життя за умов гіпоксії. Разом з тим, він чутливо реагує на дію токсичних чинників водного середовища [6, 7].

Внутрішньоклітинні термостабільні протеїни металотіонеїни належать до найбільш імовірних молекулярних мішеней впливу Me-НК. Вони здатні зв'язувати іони d-металів у тіюлатні кластери та виконують у хребетних тварин депонувальну функцію по відношенню до цинку і детоксикаційну функцію щодо кадмію. Разом з тим, за умов реконструкції *in vitro* з апо-форми, металотіонеїни здатні зв'язувати в тіюлатні кластери й інші метали, зокрема кобальт [8]. Завдяки високому вмісту

тіолів (близько 30% цистеїну в амінокислотному складі), вони також мають неензиматичний антиоксидантний потенціал [9]. Тому становить інтерес дослідити можливість їхнього залучення в систему антиоксидантного захисту за дії Me-НК [1–3, 10].

У роботі досліджено вплив Me-НК на основі кополімеру вінілпіролідону, які можуть бути перспективною формою доставки біологічно активних сполук у клітини-мішені [3, 11]. Зокрема, перспективним видається їх залучення до регуляції вмісту  $Zn^{2+}$  та  $Co^{2+}$  у клітинах. Як відомо, за біологічним значенням серед d-металів цинк поступається лише залізу. Потреба в ньому виникає під час лікування різноманітних патологічних станів: від загоювання ран до забезпечення функціональної активності інсуліну, причому зменшення вмісту  $Zn^{2+}$  у клітинах є неспецифічною ознакою не лише різноманітних захворювань, але й перебування організму в забрудненому середовищі [12].  $Co^{2+}$  забезпечує унікальні біокаталітичні процеси, у складі як вітаміну  $B_{12}$ , так і незалежних від  $B_{12}$  ензимних систем [13]. Разом з тим, обидва іони характеризуються цитотоксичністю, яка виявляється шляхом безпосередньої участі в редоксзалежних процесах для  $Co^{2+}$  або опосередковано реакційною здатністю тіолів для  $Zn^{2+}$  [7, 10].

Метою нашої роботи було дослідити біохімічні механізми впливу наноконструктивних синтезованих на основі кополімеру вінілпіролідону, що містять  $Co^{2+}$  та  $Zn^{2+}$  на металодепонувальну функцію та антиоксидантний потенціал металотіонеїнів карася сріблястого (*Carassius auratus gibelio*). Для оцінки ефективності функції цих протеїнів виявляли ознаки гено- та нейротоксичності, а також вміст енергетичних метаболітів у тканині печінки. Для з'ясування ступеня спорідненості між окремими ефектами та виокремлення найвагоміших ефектів одержані результати піддавали інтегральному і багатофакторному аналізу.

### Матеріали і методи

У дослідженні використовували дворічних особин карася сріблястого (*Carassius auratus gibelio*, *Cyprinidae*). Риб довжиною 15–20 см із середньою масою тіла 150–180 г відбирали із рибогосподарського ставу, який знаходиться в умовно екологічно чистій місцевості. У лабораторію екземпляри доставляли в аерованій воді. Дослідні умови створювали в акваріумах об'ємом 100 л із відстоюною аерованою водою. Формували шість груп риб:

одна контрольна (К) і п'ять експериментальних, до яких у воду додавали іони  $Co$  (50 мкг/л,  $CoCl_2$ ), іони  $Zn$  (100 мкг/л,  $ZnSO_4$ ),  $Co$ -НК (833 мкг/л),  $Zn$ -НК (833 мкг/л) або полімерну складову (ПС, 783 мкг/л). Воду відстоювали і змінювали через кожні дві доби, поновлюючи вміст досліджуваних сполук. Температура води становила близько 18 °С. Тварин годували кормом фірми «Акваріус» (Харків). Вміст металу контролювали за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії (С-115, ЛОМО, Санкт-Петербург, Російська Федерація). У групах  $Co$ -НК,  $Zn$ -НК та ПС вміст  $Co^{2+}$  та  $Zn^{2+}$  у воді не перевищував контрольних значень. Досліджувана концентрація металів була близькою до її вмісту в забруднених водоймах. Для  $Co^{2+}$  вона дорівнювала концентрації у крові пацієнтів із ортопедичними хром/кобальтовими імплантами після тривалого часу експлуатації [14]. Інкубація риб у досліджуваних розчинах тривала 14 дб, що вважається оптимальним строком для експериментальної акліматії гідробіонтів.

Досліди з використанням тварин проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), а також «Ухвали 1-го національного конгресу з біоетики» (Київ, 2000 р.) і рішення регіональної комісії з біоетики (протокол № 3, 2011 р.). Тварин умертвляли під ефірним наркозом. Кров відбирали гепаринізованою голкою із серця риб. Показники генотоксичності визначали в еритроцитах, а всі інші показники – у печінці. Усі процедури з відбору й обробки тканин проводили при 4 °С. Для біохімічного аналізу застосовували реактиви фірми Sigma (США).

На основі кополімеру N-вінілпіролідону (NVP), 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін (VEP) та диметиламіноетилметакрилату (DMAEM) (мольне співвідношення 1 : 1 : 1) була отримана полімерна складову (ПС) методом радикальної кополімеризації відповідних мономерів у розчині диметилформаміду за ініціювання азоізобутиронітрилом за методикою [11]. Металокомплекси (рис. 1) утворювали, змішуючи спиртові розчини ПС та  $CoCl_2$  або  $ZnSO_4$  у мольному співвідношенні метал: DMAEM для  $Co$ -НК (1 : 2) та для  $Zn$ -НК (1 : 1).

Для характеристики стану системи антиоксидантного захисту, енергетичного статусу і нейротоксичності використовували оптичні методи, описані в роботі [6]. Активність  $Cu$ ,  $Zn$ - та  $Mn$ -вмісних форм супероксиддисмутази (1.15.1.1,  $Cu$ ,  $Zn$ - та  $Mn$ -СОД) визна-

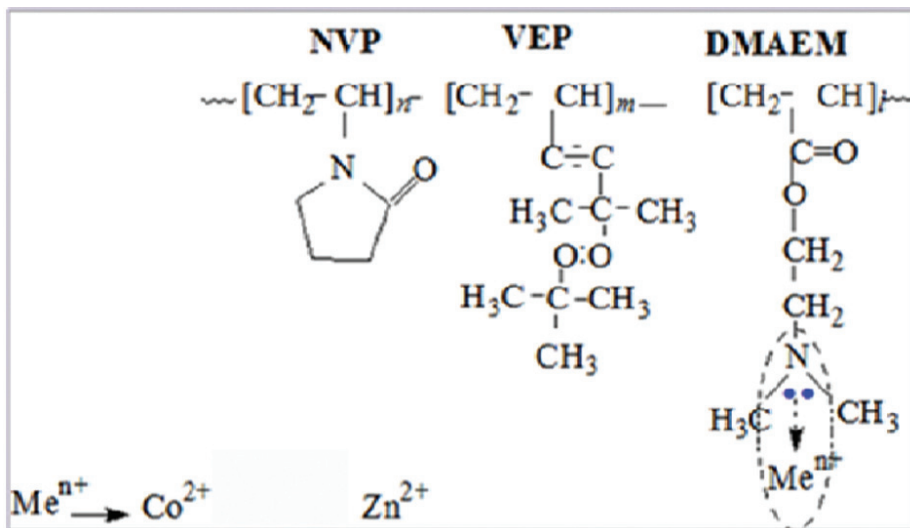


Рис. 1. Структура досліджуваних металовмісних композитів: NVP – N-вінілпіролідон, VEP – 5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3, DMAEM – диметиламіноетилметакрилат

чали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього у присутності NADH. Для визначення активності Mn-COD гомогенат попередньо інкубували із KCN для інактивації Cu,Zn-COD. Активність Cu,Zn-COD обчислювали за різницею між загальною активністю COD та активністю Mn-COD [15]. Вміст загального (GSH) і окисленого (GSSG) глутатіону визначали ензимним методом за допомогою реактиву Елмана (ДТНБ) [16]. Для визначення вмісту GSSG, перед вимірюванням (за 60 хв) до інкубаційної суміші додавали 2-вінілпіридин (кінцева концентрація 2%). Вміст металотіонеїнів визначали за методом Віаренго та співавт. [17] за взаємодією із ДТНБ після хлороформ-етанольної екстракції металотіонеїнів. При обчисленні вважали, що в 1 молі протеїну міститься така ж кількість SH-груп, як і в 20 молях GSH. Вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) вимірювали в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) як ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), а вміст карбонільних похідних протеїнів (КПП) – за їхньою здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [7]. Активність лактатдегідрогенази (1.1.1.27, ЛДГ) визначали за швидкістю окислення NADH при 340 нм у фосфатно-піруватному розчині [18], активність холінестерази (3.1.1.7) – за швидкістю гідролізу ацетилтіохолін йодиду, яку реєстрували за допомогою ДТНБ [19]. Вміст лактату та пірувату у тканині печінки визначали за методиками, описаними в роботі [18].

Вміст металотіонеїнів у хелатній формі визначали за допомогою імуноензимного аналізу прямим напівкількісним методом із використанням кролячих поліклональних антитіл до протеїну тріски (M04406201-100) («Semi-quantitative Biomarker ELISA Kit», Biosence, Швеція). Металотіонеїни виділяли як термостабільні протеїни за методом [6]. Світлопоглинання утвореного імунного комплексу реєстрували при 492 нм на імуноензимному аналізаторі Stat-Fax-303 Microstrip Reader (США).

Пошкодження хроматину визначали за появою мікроядерць та ядерних аномалій в еритроцитах периферичної крові риб. Відповідні зміни спостерігали після забарвлення цитологічних препаратів 5%-им розчином Гімзи під мікроскопом з оліїною імерсією,  $\times 1000$  і виражали з розрахунку на 1000 клітин (%) [20]. Загальна кількість проаналізованих клітин на цитологічному препараті складала не менше 2 тис. клітин.

Інтегральний індекс оксидативного стресу (ІОС) обчислювали за співвідношенням показників стану антиоксидантних чинників (сумарна активність COD і GSH) та прооксидантних проявів (ТБК-АП, КПП і GSSG) після уніфікації величин показників із врахуванням стандартного квадратичного відхилення [21].

Результати вимірів подано у вигляді  $M \pm m$ ,  $n = 8$ . Вірогідність відхилення 2 рядів значень обчислювали із використанням *t*-тесту Стьюдента. Вірогідною вважали відмінність між рядами за  $P < 0,05$ . Порівняльний аналіз

параметрів здійснювали із використанням коефіцієнта Пірсона  $r$ , центроїдного групового аналізу та побудови класифікаційного дерева, використовуючи комп'ютерні програми Statistica 8.0 та Excel для Windows-2000.

### Результати та обговорення

На рис. 2 представлені результати визначення стану системи антиоксидантного захисту печінки карася сріблястого. Встановлено, що у контрольній групі активність Мп-СОД приблизно у чотири рази вища, ніж активність Cu,Zn-СОД. Металовмісні чинники ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , Со-НК і Zn-НК) спричинюють зростання активності Мп-СОД, а  $\text{Zn}^{2+}$  і Zn-НК – ще й активності Cu,Zn-СОД. Додавання  $\text{Co}^{2+}$  і Со-НК у воду, де знаходилися риби, зменшує активність Cu,Zn-СОД, тоді як за дії ПС знижується активність обох форм СОД. Усі досліджувані чинники зменшують вміст GSH, причому за дії  $\text{Co}^{2+}$  та Со-НК цей показник зменшується майже удвічі. Со-НК і, особливо,  $\text{Zn}^{2+}$  та Zn-НК зумовлюють зростання вмісту GSSG. Усі досліджувані чинники спричинюють зменшення вмісту ТБК-АП та КПБ (за виключенням вмісту ТБК-АП за дії  $\text{Zn}^{2+}$ , який відповідає контролю). Найбільший діапазон змін показників антиоксидантного захисту зумовлювала дія  $\text{Co}^{2+}$ .

Вміст металотіонеїнів, визначений імуноензимним методом (MTi), зменшується за дії як металів, так і у разі їх застосування у складі наноконструктивів. Поряд з цим, загальний вміст металотіонеїнів, визначений за вмістом тіолів (MT-SH), за дії  $\text{Co}^{2+}$  та Со-НК зростає, тоді як за дії  $\text{Zn}^{2+}$  та Zn-НК він знижується порівняно з контролем (рис. 3).

Результати оцінки холінестеразної активності свідчать про те, що жодний із діючих чинників не зменшує цю активність у риб (рис. 4). Разом з цим, встановлено зміщення метаболізму в бік анаеробіозу, про що свідчить активація ЛДГ і зростання вмісту лактату (рис. 4) та співвідношення вмісту лактату і пірувату в печінці з  $1,4 \pm 0,3$  в контролі до значень  $3,2 \pm 0,4$ ;  $3,5 \pm 0,7$ ;  $5,1 \pm 0,5$ ;  $8,6 \pm 1,7$  та  $4,6 \pm 0,7$  за впливу Со, Со-НК, Zn, Zn-НК та ПС відповідно.

Як показують підрахунки кількості еритроцитів із мікроядрами та ядерними аномаліями (рис. 4, 5), вплив усіх досліджуваних чинників супроводжується проявами генотоксичності. Особливо значими ці прояви були за дії  $\text{Zn}^{2+}$  та ПС.

Обчислення інтегральної характеристики стану системи антиоксидантного захисту ІОС

показало (рис. 6, А), що саме  $\text{Co}^{2+}$  найістотніше активує цю систему, тоді як за дії Со-НК та Zn-НК значення цієї активності нижчі, ніж у контролі.

Використання методу багатофакторного (групового центроїдного) аналізу дозволило кількісно довести ступінь спорідненості між змінами окремих досліджуваних показників за дії різних чинників. Як видно, з рис. 6, Б, 64,2% абсолютних значень біохімічних та цитогенетичних показників належить до факторів 1 і 2, причому представники кожної групи тварин локалізовані окремо від інших. Як видно, група К (контроль) найбільш відокремлена від інших груп, а екземпляри риб, що піддавалися дії  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  та відповідного НК, утворюють спільні кластери. Побудова класифікаційного дерева дозволила встановити найвагоміші показники для розрізнення груп тварин (рис. 6, В). Так, експериментальні групи від контролю чітко відокремлюються за ознакою генотоксичності. Найзначнішою спільною особливістю груп, що зазнавали впливу певного металу та відповідного Me-НК, є характеристика вмісту MT-SH. Вона є також головною ознакою, що диференціювала групи Со-НК та ПС. Групи, що зазнавали впливу металу та відповідного Me-НК, розрізняються між собою за рівнем ядерних аномалій та активністю ЛДГ. Класифікаційне дерево нараховує дві головні гілки та шість кінцевих відгалужень, що свідчить про високу вірогідність розподілу груп за природою діючого чинника. Отже, для кожної з досліджуваних груп тварин і для спільних груп Me та відповідного Me-НК встановлені специфічні ознаки молекулярної відповіді на дію чинника, причому характеристики металотіонеїнів належать до найсуттєвіших ознак.

Порівняння здатності до біодеградації Me-НК за аналогічних умов у карася (в цьому дослідженні) і двостулкового молюска *Unionidae* [4, 5] засвідчило низку принципів відмінностей між цими видами тварин. Якщо у молюска дія кожного з чинників –  $\text{Co}^{2+}$ , Со-НК і ПС – була достатньо специфічною, то у карася виявлено істотну подібність між наслідками дії Me-НК і відповідного металу як за окремими показниками, так і за інтегральною характеристикою (рис. 6, Б). Можна припустити, що в організмі карася метал вивільняється з НК, і виявляється ефект від дії вивільнених іонів металу. Це узгоджується з даними, які свідчать про вищий рівень розвитку ензимних систем біотрансформації ксенобіотиків у риб, ніж у безхребетних гідробіонтів [22].



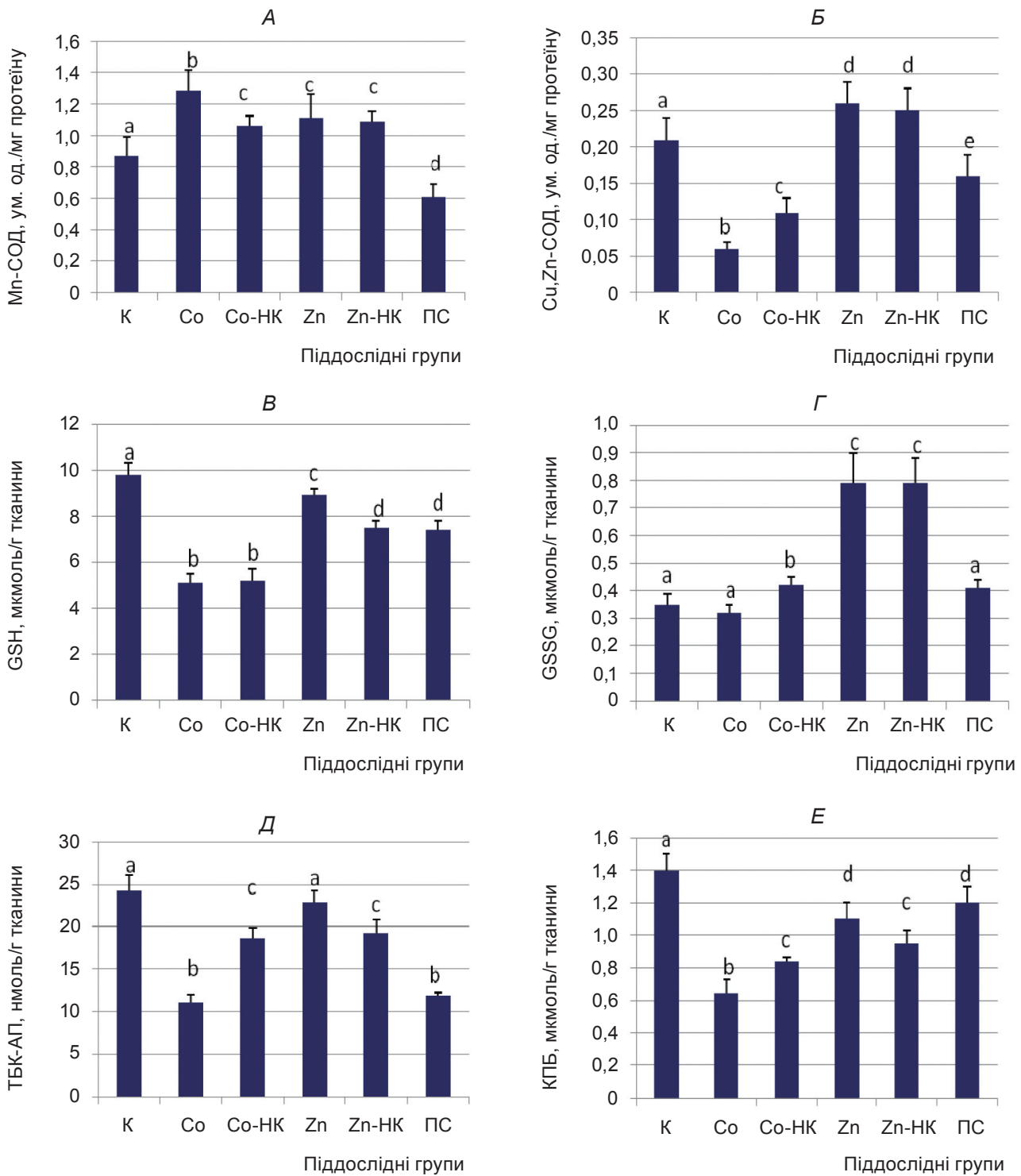


Рис. 2. Показники системи оксидативного стресу печінки карася в контролі (К) та за впливу кобальту (Co), цинку (Zn), металовмісних нанокompatитів (Co-НК, Zn-НК) та полімерної складової (ПС). А – Mn-супероксиддисмутазна активність, Б – Cu,Zn-супероксиддисмутазна активність; В – концентрація загального глутатіону; Г – концентрація окисленого глутатіону; Д – концентрація ТБК-активних продуктів; Е – концентрація карбонільних похідних протеїнів;  $M \pm t$ ,  $n = 8$ . Тут і на рис. 3–4 однаковою літерою над стовпчиками позначено невірні відмінності між показниками,  $P > 0,05$

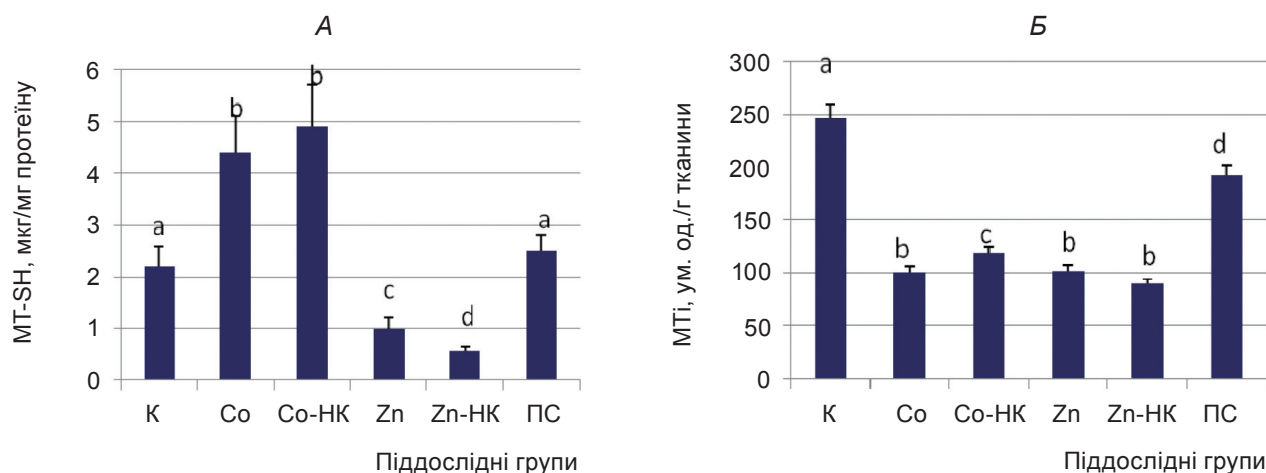


Рис. 3. Концентрація металотіонеїнів у печінці карася в контролі (К) та за впливу кобальту (Co), цинку (Zn), металовмісних нанокompatитів (Co-НК, Zn-НК) і полімерної складової (ПС) визначена за кількістю тіолових груп (MT-SH) (А) та даними імуноензимного аналізу (MTi) (Б)

Аналіз одержаних результатів також свідчить про принципову відмінність між впливом  $\text{Co}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$ , як у вільній формі, так і у складі НК. У визначенні цієї відмінності головним критерієм є рівень MT-SH (рис. 6, В). Очевидно, кобальт діє як індуктор експресії металотіонеїнів, тоді як есенціальний для цих протеїнів цинк, навпаки, пригнічує їхню експресію. Здатність кобальту слугувати індуктором металотіонеїнів описана для хребетних тварин [23]. З іншого боку, пригнічення синтезу металотіонеїнів за дії  $\text{Zn}^{2+}$  і Zn-НК не суперечить існуючим уявленням, оскільки відомо [23], що  $\text{Zn}^{2+}$  індуктує металотіонеїни за значно вищих його концентрацій, ніж ті, які використовували в цій роботі. Так, якщо значне збільшення концентрації металотіонеїнів у культурі клітин гепатоми мишей RH-35 досягалося вже за концентрації іонів кадмію 0,18 мг/л, то для  $\text{Zn}^{2+}$  — лише за концентрації 12 мг/л [24].

Разом з тим, причиною зменшення вмісту MTi, що спостерігається в кожній дослідній групі, може бути спонтанна модифікація, полімеризація і втрата металу, що призводить до пригнічення імунологічної активності [25]. Як відомо, нехелатована, або апоформа, металотіонеїну в клітинах досить стабільна [26]. Якщо у молюсків головною функцією металотіонеїнів є депонування іонів металів, то у риб металотіонеїни індукуються численними стресорними чинниками, зокрема прооксидантами, проте механізм реалізації їх антистресорної дії залишається гіпотетичним [5, 9, 23]. Відомо, що металотіонеїни здатні знешкоджувати оксирадикали знач-

но ефективніше за інші протеїни [9, 27]. При цьому, реакційна здатність SH-груп цистеїну зростає після вивільнення металу з металотіонеїнів, що сприяє їх участі в антиоксидантному захисті [9]. Показано, що надекспресія MT захищає ендотелій легеневої артерії від впливу прооксидантів, що зумовлює знешкодження пероксид-радикалів у незалежний від металу спосіб і запобігає пероксидації ліпідів у клітинах [27]. Слід зазначити, що більшість таких робіт виконано *in vitro*, тоді як наше дослідження показників системи антиоксидантного захисту та металотіонеїнів свідчить, що ця функція реалізується також і у цілісному організмі за дії  $\text{Co}^{2+}$  та Co-НК, коли надекспресія MT-SH може ефективніше забезпечувати антиоксидантний захист. Як свідчать результати дослідження генотоксичності та показників енергетичного обміну, за дії  $\text{Co}^{2+}$  і Co-НК зміни цих характеристик є найменшими, що підтверджує успішну реалізацію антиоксидантного потенціалу MT-SH.

Отже, саме поєднання визначення MT-SH і MTi дозволило нам запропонувати новий біохімічний механізм для пояснення антагонізму біологічної дії  $\text{Co}^{2+}$  та  $\text{Zn}^{2+}$ . Протилежний вплив  $\text{Co}^{2+}$  та  $\text{Zn}^{2+}$  продемонстрований також під час дослідження проапоптотичної активності [28]. На користь цього антагонізму свідчать і результати багатофакторного аналізу, який показав, що характеристика MT-SH належить до головних ідентифікаторів специфіки груп (рис. 5, В).

Нами не виявлено пригнічення холінестеразної активності, що свідчить про відсутність гостротоксичного впливу

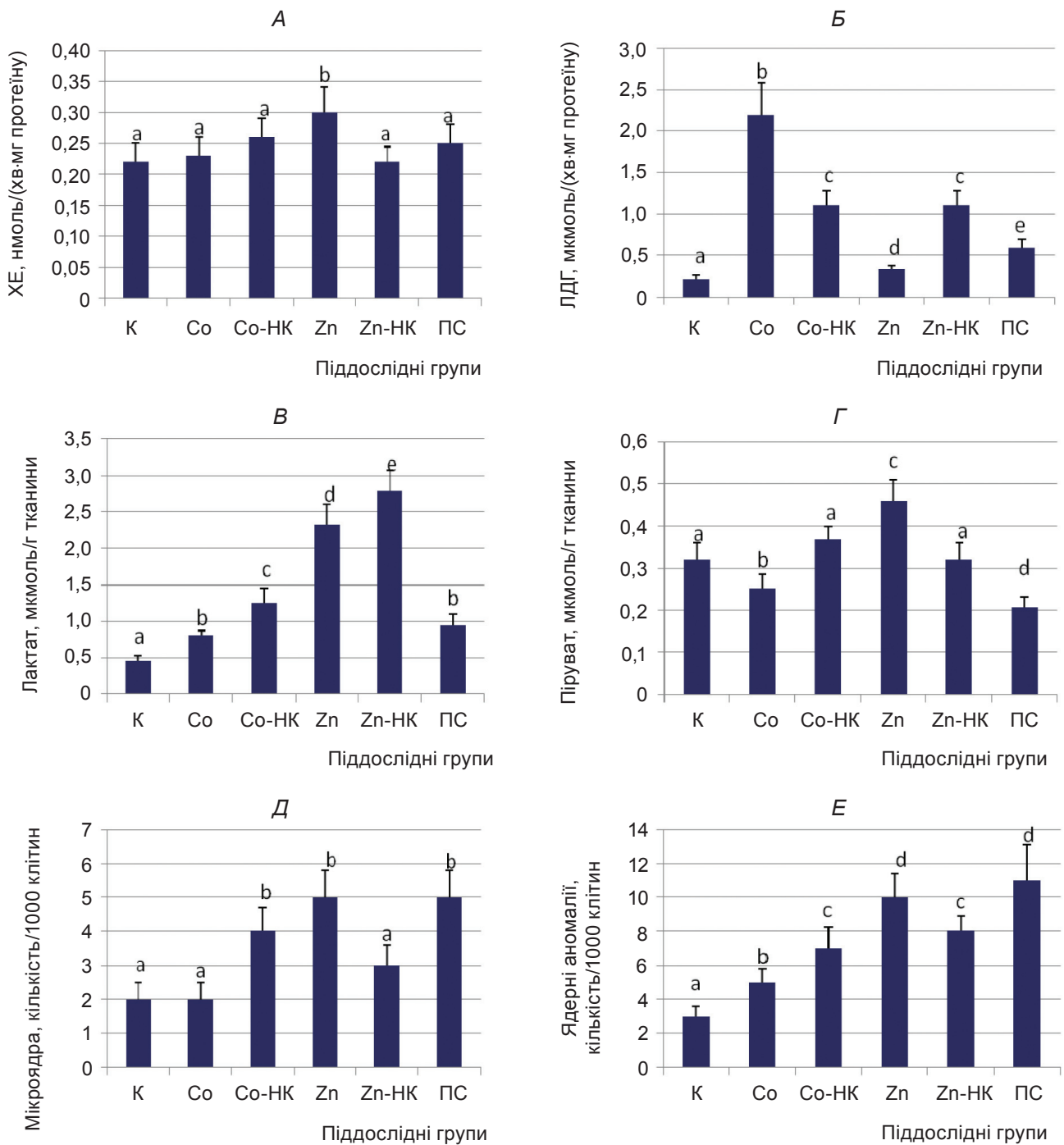


Рис. 4. Показники токсичності, енергетичного статусу та трансформації ксенобіотиків у печінці карася в контролі (К) та за впливу кобальту (Co), цинку (Zn), металовмісних нанокompatитів (Co-НК, Zn-НК) та полімерної субстанції (ПС): А – холінерастазазна активність; Б – лактадегідрогеназна активність; В – концентрація лактату; Г – концентрація пірувату; Д – кількість еритроцитів з мікродрама; Е – кількість еритроцитів з ядерними аномаліями

досліджуваних чинників [6]. Разом з тим, хоча їх концентрації були на декілька порядків нижчими за ті, що традиційно використовують для вивчення впливу іонів металів на організм риби [7], було виявлено і деякі спільні для

двох видів тварин (риби і двостулкові молюски) негативні ефекти, а саме активація анаеробного перетворення клітинних субстратів. Здатність  $Co^{2+}$  зумовлювати гіпоксію і стимулювати експресію залежного від гіпоксії

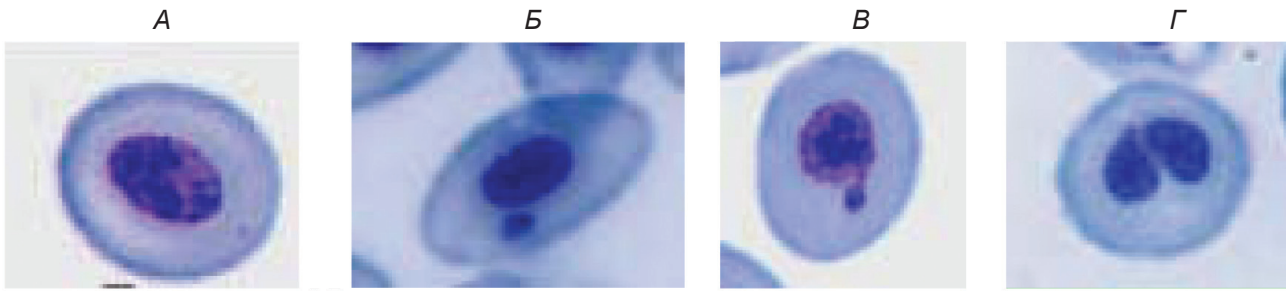


Рис. 5. Мікрофотографії еритроцитів периферичної крові карася з нормальним ядром (А), мікроядром (Б) та ядерними аномаліями (В, Г) після забарвлення 5%-им розчином Гімза під олійною імерсією,  $\times 1000$

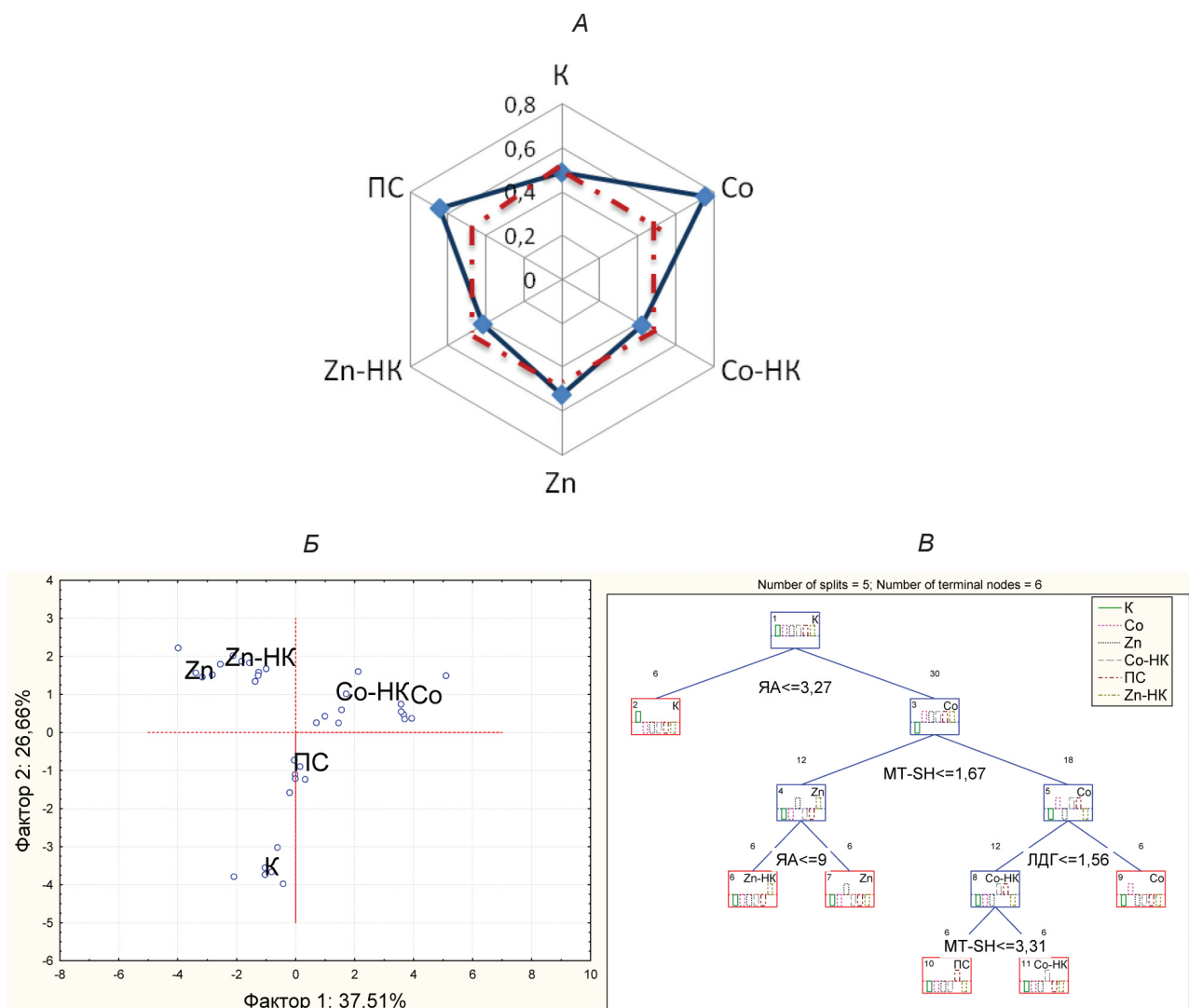


Рис. 6. Інтегральний аналіз впливу нанокмполімерів та їхніх складових на біохімічні та цитогенетичні показники карася в контролі (К) та за впливу кобальту (Со), цинку (Zn), металовмісних нанокмполімерів (Со-НК, Zn-НК) і полімерної субстанції (ПС): А – індекс оксидативного стресу (ІОС), Б – центроїдний груповий аналіз приналежності показників до спільного кластера, В – класифікаційне дерево. А: штрихпунктирною лінією показано рівень ІОС у контрольній групі; В: класифікаційні показники подано у вершинах кутів, ЯА – кількість еритроцитів з ядерними аномаліями, ЛДГ – лактатдегідрогеназна активність; MT-SH – концентрація металотіонеїнів, визначена за кількістю тіолових груп



фактора HIF-1 $\alpha$  було продемонстровано і у культурі епітеліальних клітин слинної залози людини [28].

Таким чином, вперше встановлено, що реакційна здатність металовмісних нанокompatитів в організмі істотно залежить не лише від властивостей цих матеріалів, але й від виду тестованого організму, причому специфіка відповіді МТ у карася пов'язана із активацією їх антиоксидантного потенціалу за впливу прооксидантних чинників. Карась сріблястий становить зручну і коректну експериментальну модель для оцінки потенційних біоризиків використання Me-НК для людини. Характеристика металодепонувальної функції в поєднанні з визначенням вмісту протеїну металотіонеїнів дозволяє вибірково оцінити специфіку впливу різних металовмісних чинників на організм.

*Роботу виконано за підтримки НАН України у рамках науково-дослідної роботи № 34-П.*

**ФУНКЦИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ И СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ Co- И Zn-СОДЕРЖАЩИХ НАНОКОМПОЗИТОВ НА КАРАСЯ СЕРЕБРИСТОГО (*Carassius auratus gibelio*)**

Г. И. Фальфушинская<sup>1,2</sup>, Л. Л. Гнатишина<sup>1</sup>,  
О. О. Турта<sup>1</sup>, О. Б. Столяр<sup>1</sup>,  
Н. Е. Митина<sup>3</sup>, А. С. Заиченко<sup>3</sup>,  
Р. С. Стойка<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, Украина;

<sup>2</sup>Тернопольский государственный медицинский университет им. И. Я. Горбачевского, Украина;  
e-mail: halynka.f@gmail.com;

<sup>3</sup>Национальный университет «Львовская политехника», Украина;

<sup>4</sup>Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

Исследовано влияние нанокompatитов кобальта и цинка (Co- и Zn-НК соответственно), синтезированных на основе винилпирролидона (ПС), на металлодепонирующие протеины с антиоксидантным потенциалом – металлотіонеїни (МТ) карася сріблястого (*Carassius auratus gibelio*). На протяжении 14 дней в аквариумы, в которых находились разные группы рыб, добавляли Co<sup>2+</sup> (50 мкг/л), Zn<sup>2+</sup> (100 мкг/л), Co-НК (833 мкг/л), Zn-НК (883 мкг/л) или полимерную составляющую (ПС, 783 мкг/л). Установлено, что реакция МТ высокоспецифична и к ионам металлов,

и к их нанокompatитам: Co<sup>2+</sup> и Co-НК увеличивают общее содержание МТ (МТ-SH) и активируют систему антиоксидантной защиты, а Zn<sup>2+</sup> и Zn-НК – уменьшают содержание МТ-SH и угнетают антиоксидантную защиту. Все формы исследуемых металлов уменьшают содержание иммунореактивной хелатной формы МТ (МТи) и восстановленного глутатиона, активацию анаэробного обмена, Mn-супероксиддисмутазы, снижают содержание продуктов окислительной деструкции протеинов и липидов в ткани печени, которое сопровождается увеличением количества эритроцитов с ядерными аномалиями, но не снижают холинэстеразную активность. Показано, что соотношение концентраций МТ-SH и МТи, антиоксидантный потенциал МТ зависят от содержания его апоформы. Полученные данные указывают на то, что у карася происходит частичная биодеградация Me-НК.

**Ключевые слова:** металлосодержащие нанокompatиты, кобальт, цинк, металлотіонеїны, карась сріблястий, антиоксидантная защита, генотоксичность.

**FUNCTIONS OF METALLOTHIONEINS AND A SYSTEM OF ANTIOXIDANT DEFENSE UNDER THE EFFECT OF Co- AND Zn-CONTAINING NANOCOMPONENTS ON CRUCIAN CARP (*Carassius auratus gibelio*)**

H. I. Falfushynska<sup>1,2</sup>, L. L. Gnatyshyna<sup>1</sup>,  
O. O. Turta<sup>1</sup>, O. B. Stoliar<sup>1</sup>, N. E. Mitina<sup>3</sup>,  
O. S. Zaichenko<sup>3</sup>, R. S. Stoika<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine;

<sup>2</sup>I. Ya. Horbachevski Ternopil State Medical University, Ukraine;  
e-mail: halynka.f@gmail.com;

<sup>3</sup>Lviv Polytechnic National University, Ukraine;

<sup>4</sup>Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

The effect of metal-nanocomposites (Me-NC) of cobalt and zinc (Co- and Zn-NC, correspondingly) synthesized on the basis of vinylpyrrolidone (PS) on the metal-accumulative proteins with antioxidant potential metallothioneins (MT) in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) was studied. Fish was subjected to the effect of Co-NC, Zn-NC, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> or polymer carrier (PC) in the concentrations correspondent to 50  $\mu\text{g}\times\text{Co}/\text{l}$  or 100  $\mu\text{g}\times\text{Zn}/\text{l}$  during 14 days. It was shown that the MTs response is highly specific for the nature of metal, both in ion and Me-NC form: the effect

of Co and Co-NC provoked the elevation of total MT concentration (MT-SH) and activation of antioxidant defence, whereas Zn and Zn-NC induced the decrease of the concentration of MT-SH and the inhibition of antioxidant defense. All the exposures provoked the decrease of the concentration of immunoreactive chelating MT form (MTi) and reduced glutathione, activation of anaerobiosis and Mn-superoxide dismutase, and also decrease of the concentration of proteins and lipids oxidative injury products. It was accompanied by the increase of the content of erythrocytes with nuclear abnormalities but did not cause the decrease of choline esterase activity. According to the rate of MT-SH and MTi concentrations, antioxidant potential of MTs is determined by its apoform. Our data indicate that partial biodegradation of Me-NC occurs in the organism of crucian carp.

**Key words:** metal nanocomposites, cobalt, zinc, metallothioneins, crucian carp, antioxidant defense, genotoxicity.

1. Handy R. D., von der Kammer F., Lead J. R. et al. // *Ecotoxicol.* – 2008. – **17**, N 4. – P. 287–314.
2. Colognato R., Bonelli A., Ponti J. et al. // *Mutagenesis.* – 2008. – **23**, N 5. – P. 377–382.
3. Luther E. M., Schmidt M. M., Diendorf J. et al. // *Neurochem. Res.* – 2012. – **37**, N 8. – P. 1639–1648.
4. Фальфушинська Г. І., Гнатишина Л. Л., Столяр О. Б. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 5. – С. 14–21.
5. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Stoliar O. et al. // *Chemosphere.* – 2012. – **88**, N 8. – P. 925–936.
6. Falfushynska H. I., Gnatyshyna L. L., Stoliar O. B. et al. // *Comp. Biochem. Physiol.* – **154 C**, N 3. – P. 242–253.
7. Kubrak O. I., Husak V. V., Rovenko B. M. et al. // *Chemosphere.* – 2011. – **85**, N 6. – P. 983–989.
8. Overnell J., Good M., Vasak M. // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – **172**, N 1. – P. 171–177.
9. Krezel A., Maret W. // *Biochem. J.* – 2007. – **402**, N 3. – P. 551–558.
10. Buerki-Thurnherr T., Xiao L., Diener L. et al. // *Nanotoxicology.* – 2012. – In press.
11. Zaichenko A. S., Voronov S. A., Kuzayev A. I. et al. // *J. Appl. Polymer Sci.* – 1998. – **70**, N 12. – P. 2449–2455.
12. Beregova T. V., Eshchenko Y. V., Bovt V. D. et al. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* – 2011. – **2**, N 13. – P. 211–216.
13. Kobayashi M., Shimizu S. // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – **261**, N 1. – P. 1–9.
14. Figgitt M., Newson R., Leslie I. J. et al. // *Mutat. Res.* – 2010. – **688**, N 1–2. – P. 53–61.
15. Beauchamp C., Fridovich I. // *Anal. Biochem.* – 1971. – **44**, N 1. – P. 276–287.
16. Anderson M. E. // *Meth. Enzymol.* – 1985. – **113**. – P. 548–555.
17. Viarengo A., Ponzano E., Dondero F. et al. // *Mar. Environ. Res.* – 1997. – **44**, N 1. – P. 69–84.
18. *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H. U., ed.), 3rd ed., Vol VI, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK, 1988. – 908 p.
19. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. J. et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – **7**, N 2. – P. 88–95.
20. Barsiene J., Andreikenaite L., Rybakovas A. // *Ekologija.* – 2006. – **1**, N 1. – P. 25–31.
21. Пам. 45298 UA, МПК А61К 38/04; В63С 9/00; С12N 9/00; G01N 33/00. Спосіб інтегральної оцінки біологічної відповіді на стан водного середовища / Столяр О. Б., Фальфушинська Г. І., Мішук О. В. – Опубл. 10.11.2009, Бюл. № 21.
22. Livingstone D. R. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1998. – **120 A**, N 1. – P. 43–49.
23. Bracken W. M., Klaassen C. D. // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 1987. – **22**, N 2. – P. 163–174.
24. Yang J., Cao Y., Yang M. S. // *Chem. Biol. Interact.* – 1998. – **115**, N 2. – P. 109–116.
25. Andersen R. A., Daae H. L. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1988. – **90 B**, N 1. – P. 59–67.
26. Sutherland D. E., Summers K. L., Stillman M. J. // *Biochemistry.* – 2012. – **51**, N 33. – P. 6690–6700.
27. Pitt B. R., Schwarz M., Woo E. S. et al. // *Am. J. Physiol.* – 1997. – **273**, N 4. – P. 856–865.
28. Akita K., Okamura H., Yoshida K. et al. // *Int. J. Oncol.* – 2007. – **31**, N 4. – P. 923–929.

Отримано 04.10.2012