

8. Дмитренко Г. М. Cr(VI) та Mn(IV) – термінальні акцептори електронів для *Acinetobacter calcoaceticus* Ac-1 // Доп. НАН України. – 2003. – № 4. – С. 181–184.
9. Дмитренко Г. М., Коновалова В. В., Шум О. А. Восстановление Cr(VI) бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиология. – 2003. – **72**, № 3. – С. 370–373.
10. Шульц М. М., Писаревский А. М., Полозова И. Р. Окислительный потенциал. – Ленинград: Химия, 1984. – 160 с.
11. Dmytrenko G. M., Ereshko T. V., Konovalova V. V. The successive reduction of Cr(VI) and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or Mn(IV) ions present in the cultivation medium of denitrifying bacteria // Microbiology. – 2006. – **75**, No 2. – P. 125–128.
12. Myers C. R., Nelson K. H. Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with iron and sulfur // Geochim. et cosmochim. acta. – 1988. – **52**. – P. 2727–2732.
13. Nelson K. H., Saffarini G. Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology and regulation // Annu. Rev. Microbiol. – 1994. – **48**. – P. 311–343.
14. Spear J. R., Figueroa L. A., Honeyman B. D. Modeling reduction of uranium U(VI) under variable sulfate concentration by sulfate-reducing bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – **66**, No 9. – P. 3711–3721.
15. Дмитренко Г. М. Чи існує облигатний аеробіоз у бактерій? // Доп. НАН України. – 2004. – № 6. – С. 177–180.

Національний аграрний університет України, Київ

Надійшло до редакції 25.02.2008

УДК 57.033.084.2.577.112

© 2008

О. В. Міщук, О. Б. Столяр, В. О. Арсан

## Властивості металотіонеїнів прісноводного двостулкового молюска як біомаркерів стану водного середовища

(Представлено академіком НАН України В. Д. Романенком)

*We have investigated freshwater bivalves *Anodonta cygnea* from the native population of the Gnizna river (the basin of the Dniester river) in a rural area (N group) and after their dislocation for 30 days in the urban zone of the Gnizna river (U group) and in the recreation zone of the Ternopil Lake (R group). The mussels' dislocation under new conditions in both cases caused the changes of the chromatography behavior of metallothioneins (MTs) and a decrease of the metal-binding function of MTs alongside with an increase of the zinc content in the mussels' tissues. A decrease of the copper content in the tissues of the mussels of U and R groups was observed. Moreover, the part of copper in MTs of mussels from the Ternopil Lake and the river was increased and decreased, respectively. The variation of the ratio of the zinc and copper contents in MTs of mussels can be a potential biomarker of the changes in water conditions.*

Розвиток адаптаційних відповідей до факторів середовища, як природного, так і техногенного походження, у різних організмів, у тому числі й гідробіонтів, пов'язаний переважно з молекулярними механізмами, що відповідають за збереження гомеостазу [1]. В умовах зростання забруднення водних екосистем різноманітними токсикантами, зокрема важкими металами, становить інтерес вивчення системи регуляції гомеостазу металів у тканинах гідробіонтів та використання цих механізмів у біоіндикації стану природних водойм [2].

Двостулкових молюсків — сидячих фільтраторів, використовують для моніторингу стану водного середовища завдяки їхній здатності накопичувати відносно високі концентрації токсикантів [3]. Проте відомо, що у популяціях молюсків, які постійно перебувають у зонах техногенного навантаження, можуть відбуватись генетичні адаптації до умов існування [4]. Тому переселення молюсків з відносно чистої водойми в забруднену на термін, достатній для фенотипічної адаптації, тобто активний біомоніторинг, розглядається як потенційно дієвий прийом біоіндикації природних водойм [6].

Металотіонеїни (МТ) — це низькомолекулярні термостабільні білки цитозолу з високим вмістом цистеїну, які депонують іони цинку, міді та кадмію [6]. Використання МТ як біомаркерів забруднення водного середовища зумовлене тим, що МТ є стресорними білками, які індукуються іонами важких металів, у першу чергу кадмієм, та низкою інших чинників [4, 7, 8]. Проте у більшості досліджень при вивченні змін концентрації МТ не враховувалися їхні фізико-хімічні особливості залежно від змін умов середовища [2, 5]. Разом з тим безхребетним притаманна індукція різних хроматографічних форм МТ залежно від природи чинника [8]. Зокрема, для молюсків виявлено, що відмінності стану МТ залежно від сезону або ж дії різних концентрацій іонів міді пов'язані із співвідношенням вмісту цинку і міді у їх складі [9, 10]. Раніше ми досліджували молюсків, які були адаптовані до нових умов протягом 15 діб [11]. Проте цей термін інколи вважають недостатнім. Тому метою дослідження було порівняти фізико-хімічні властивості МТ молюсків із природної популяції та після їх перебування в нових водоймах протягом 30 діб.

Дослідження проводили восени 2006 р. на шестирічних особинах прісноводного двостулкового молюска *Anodonta cygnea* масою 30–36 г та довжиною мушлі 7–8 см. Тварин для дослідження відбирали вручну з ділянки р. Гнізна (притока р. Серет, басейн р. Дністер) у с. Кровінка Тернопільської обл. (N група). Молюсків переселяли в ділянку р. Гнізна в м. Тербовля, де безпосередньо на березі існує стихійне сміттєзвалище (U група) та в Тернопільський став, поблизу зони болотистих мисливських угідь (R група). Тварин утримували 30 діб у пластикових боксах розміром 30 × 30 × 60 см з отворами, які закріплювали на дні водойми на глибині близько 80 см [12]. Після відбору молюсків утримували в лабораторних умовах у аерованій воді з відповідної водойми не більше доби.

Для дослідження використовували зябра та травну залозу. Відбір тканин та їх дослідження проводили за температури близько 4 °С. МТ виділяли шляхом двоетапної хроматографії термостабільного екстракту гомогенату тканин на сефадексі G-50 (“Pharmacia”) та на ДЕАЕ-целюлозі, як було описано нами раніше [9]. Після об'єднання проб кожної фракції (20 мл) проводили вимірювання УФ спектрів та визначення вмісту металів. Вимірювали також загальний вміст металів (міді, цинку, марганцю, свинцю, кадмію та заліза) у тканинах на атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115 після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням t-тесту Стьюдента в програмі Microsoft Excel для Windows-XP.

У результаті гель-хроматографії термостабільних білків на сефадексі G-50 (рис. 1, а, б) ми отримали низькомолекулярну фракцію, ідентифіковану як МТ-вмісну за ознаками термостабільності, молекулярної маси та особливостей світлопоглинання [6] (співвідношення величин світлопоглинання  $D_{254}/D_{280}$  МТ-вмісної фракції становить від 2,0 до 10,0 проти 1,0 для високомолекулярної фракції). При елюції на ДЕАЕ-целюлозі (див. рис. 1, в, г) МТ-вмісна фракція утворює ізоформи МТ-1 (0,27 М NaCl), МТ-2 (0,36 М NaCl) або МТ-2а (0,40 М NaCl). При цьому для молюсків груп N і R притаманна наявність обох форм МТ із специфічними для цих білків спектральними ознаками (рис. 2), тоді як в U групі втра-

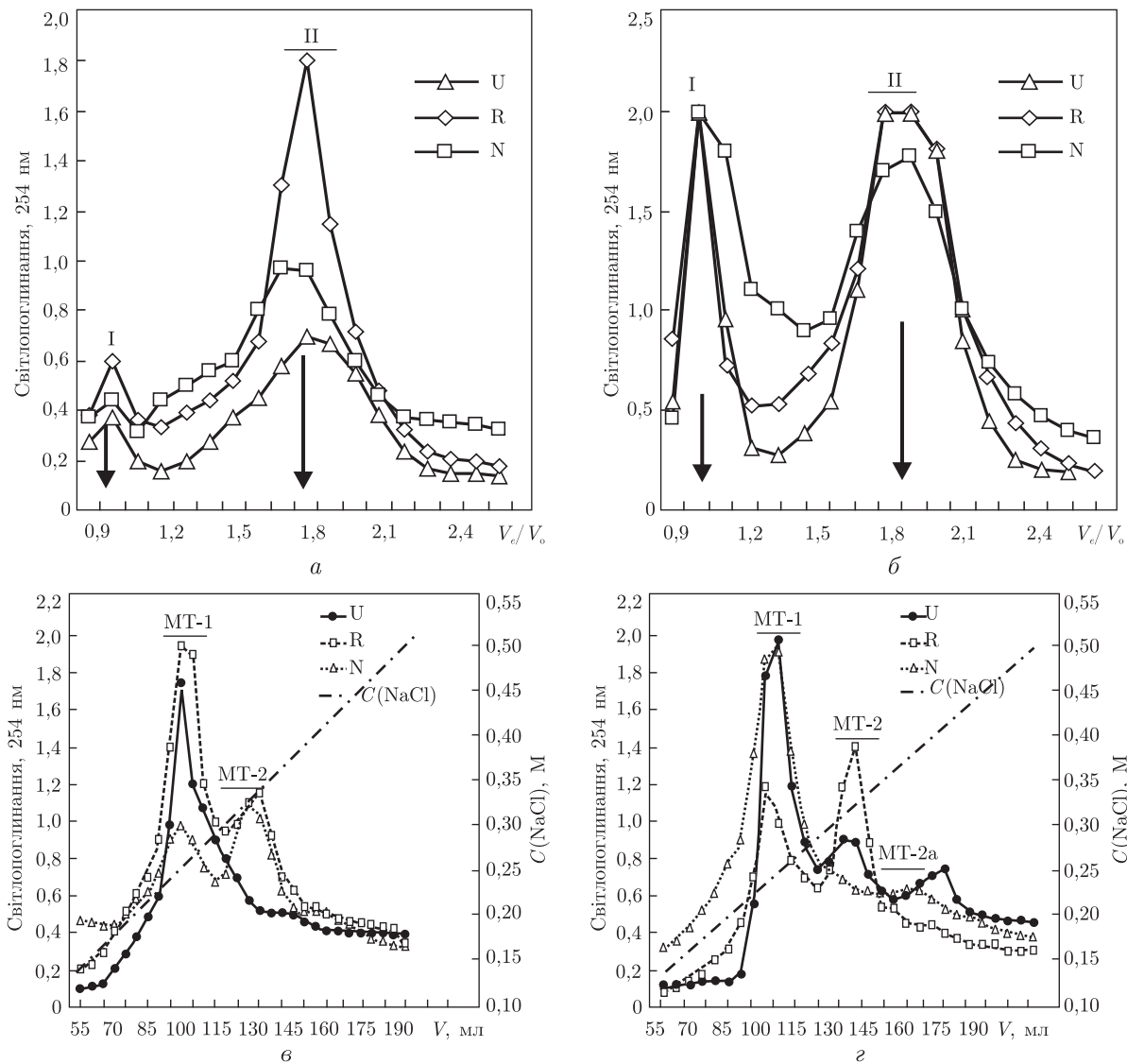


Рис. 1. Профілі елюції термостабільних білків тканин беззубки на сефадексі G-50 (а – зябра, б – травна залоза) та металотіонеїнів на ДЕАЕ-целюлозі (в – зябра, г – травна залоза)

чається МТ-2 (у зябрах) або ж з'являється додаткова фракція без спектральних ознак МТ (у травній залозі).

У складі МТ беззубок N групи зв'язується переважна частина міді тканин (96% у зябрах та 69% у травній залозі), тоді як на цинк припадає відповідно 1,6 та 73% вмісту металу у тканині (табл. 1, рис. 3). За співвідношенням вмісту Zn : Cu у складі МТ вони можуть бути ідентифіковані як Cu, Zn-МТ [8]. У молюсків U групи спостерігається зменшення вмісту міді в МТ і її частки від загального вмісту в зябрах, тоді як у молюсків R групи частка МТ у депонуванні міді (у травній залозі) навіть зростає. Вміст цинку в МТ молюсків з R і U груп також зменшується (за винятком травної залози молюсків U групи), як і частка МТ у зв'язуванні цинку в тканині, особливо в R групі. У результаті співвідношення вмісту Zn : Cu у складі МТ у молюсків R групи помітно зменшується, а U групи – зростає. Ці

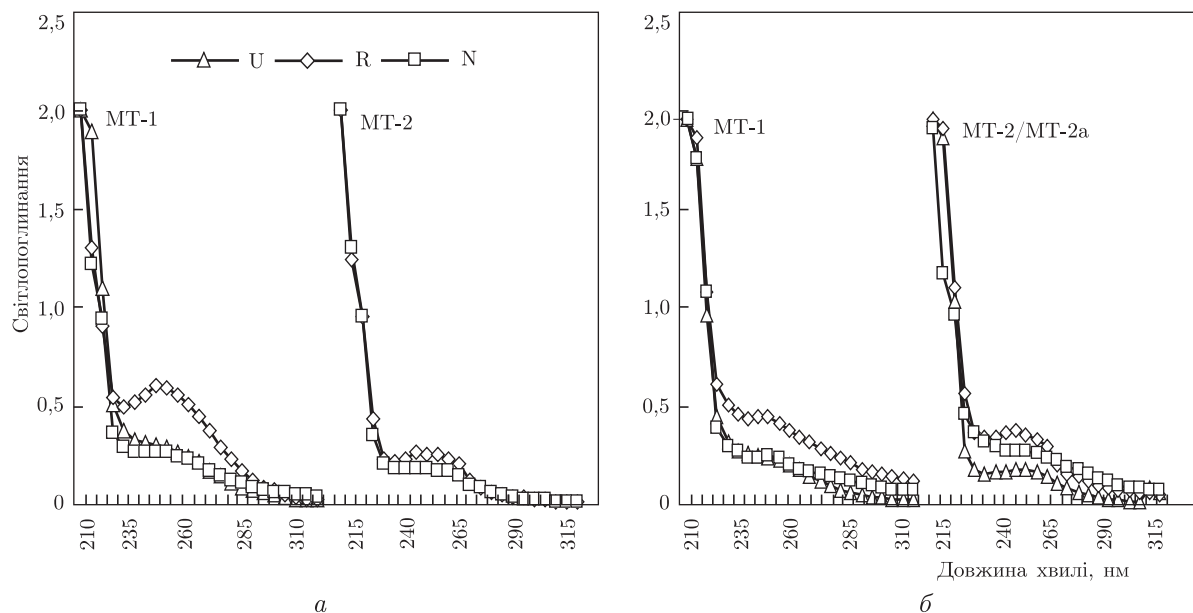


Рис. 2. УФ спектри зябер (а) і травної залози (б) ізоформ металотіонеїнів МТ-1 та МТ-2 тканин беззубки

зміни складу МТ відбуваються на тлі істотних змін вмісту важких металів у тканинах молосків. Так, у молосків R групи спостерігається зменшення вмісту міді та збільшення цинку і марганцю в тканинах, а у молосків U групи — значне збільшення вмісту цинку в обох тканинах за протилежних змін вмісту міді в зябрах і травній залозі. Концентрація заліза в тканинах у нових умовах не змінюється. Кадмій та свинець в тканинах та МТ не виявлені.

Хімічний аналіз води із досліджуваних ділянок показав найвищий рівень забруднення сполуками міді та цинку в урбанізованій зоні (табл. 2).

З літератури відомо, що прісноводні двостулкові молоски, особливо анодонта, містять у тканинах досить високі концентрації марганцю, заліза та цинку [13, 14]. Причому вміст заліза та марганцю в тканинах беззубки є стабільним показником, тоді як концентрація цинку, як і його вміст, в МТ значно змінюється залежно від місця відбору тварин та сезону [10, 11, 15]. Очевидно, виявляється недосконалість регуляції вмісту цинку у молосків,

Таблиця 1. Вміст металів у тканинах беззубки за умов переселення, мкг/г вологої тканини ( $M \pm t$ ;  $n = 6$ )

Досліджувана зона	Мідь	Цинк	Марганець	Залізо
Зябра				
N	$2,65 \pm 0,06$	$118,4 \pm 19,2$	$3453 \pm 305$	$1296 \pm 194$
R	$1,98 \pm 0,25^*$	$132,7 \pm 21,5$	$5390 \pm 695^*$	$1524 \pm 229$
U	$3,04 \pm 0,31^*$	$354,8 \pm 28,9^{**}$	$3491 \pm 135$	$976 \pm 198$
Травна залоза				
N	$5,23 \pm 0,38$	$9,5 \pm 0,6$	$240 \pm 41$	$1242 \pm 134$
R	$2,16 \pm 0,29^{**}$	$43,2 \pm 5,4^{**}$	$237 \pm 95$	$931 \pm 118$
U	$3,75 \pm 0,44^*$	$163,4 \pm 15,5^{**}$	$133 \pm 37$	$755 \pm 220$

Примітка. Тут і в табл. 2 відмінність між природною та переселеними групами тварин вірогідна:  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,001$  відповідно.

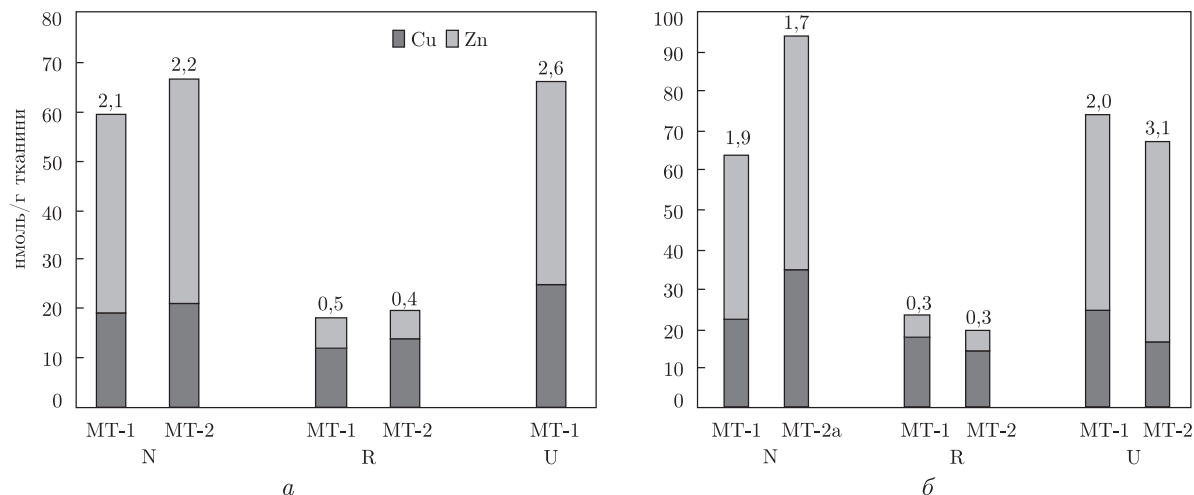


Рис. 3. Вміст міді та цинку і їх співвідношення в металотіонеїнах зябер (а) і травної залози (б) беззубки

особливо у моллюсків U групи. Поряд з цим моллюскам притаманний досить досконалий рівень регуляції вмісту міді, що узгоджується з нашими попередніми результатами [9, 10] і, очевидно, зумовлено участю МТ у забезпеченні цим металом дихального білка гемоціаніну та переконливо продемонстровано у інших безхребетних [8]. Зростання частки металу у нез'язаній з МТ формі може посилювати його токсичність внаслідок взаємодії з іншими, неспецифічними, клітинними мішенями і, в результаті цього, стимуляції оксидативного стресу [1, 9]. Нами саме у моллюсків U групи спостерігалось значне збільшення вмісту як цинку, так і міді у нез'язаній з МТ формі, що дає підставу прогнозувати погіршення якості їх існування в цій ділянці водойми. Водночас вивчення лише загального вмісту металів у тканинах не дає достатньої інформації для оцінки впливу умов середовища на організм моллюсків, що узгоджується і з даними інших дослідників [13, 15].

Порівняння профілів елюції МТ різних груп моллюсків свідчить про те, що саме за умов урбанізованого забруднення вони втрачають типовий вигляд, що також свідчить про несприятливі умови існування в цій місцевості. На підставі визначення металзв'язувальної функції можемо також відзначити досить високий рівень експресії МТ у моллюсків природної популяції та U групи і порівняно низький у моллюсків R групи. Оскільки відомо,

Таблиця 2. Хімічні параметри води різних ділянок р. Гнізна та Тернопільського ставу ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ )

Параметр	Місце відбору проб води		
	с. Кровінка	Урбанізована зона	Рекреаційна зона
pH	6,8	5,5	6,3
Фосфати, мкмоль/л	$0,24 \pm 0,05$	$0,16 \pm 0,01^*$	$0,26 \pm 0,04$
Окиснюваність, мг O <sub>2</sub> /л	$7,7 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,2^*$
Твердість води, мг-екв/л	$12,2 \pm 0,2$	$14,7 \pm 1,2$	$8,8 \pm 0,2^*$
Нітрити, мг/л	$0,32 \pm 0,0$	$0,35 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,02$
Cu, мкг/л	$3,4 \pm 0,4$	$7,2 \pm 1,2^*$	$4,6 \pm 0,2$
Zn, мкг/л	$31,1 \pm 6,4$	$65,4 \pm 5,8^*$	$24,8 \pm 1,4$
Mn, мкг/л	$62,3 \pm 5,1$	$9,5 \pm 1,5^*$	$24,1 \pm 1,1^*$
Fe, мкг/л	$199,4 \pm 10,5$	$217,3 \pm 15,5$	$153,1 \pm 15,5$
Cd, мкг/л	$4,1 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1^*$

що індукція МТ здійснюється за стресорних умов [1, 8, 9], можна оцінити умови водного оточення для R групи, де синтез Cu, Zn-МТ здійснюється на фоновому рівні, як найбільш сприятливі для існування молюсків. Така порівняльна оцінка водойм підтверджується і на підставі аналізу води. Однак реальні компоненти забруднення в урбанізованій ділянці можуть мати комплексну природу, що не відображається рутинним хімічним аналізом, а лише специфікою властивостей МТ.

Таким чином, перебування молюсків протягом одного місяця в нових умовах існування приводить до селективних змін хроматографічної поведінки та металзв'язувальної функції їх МТ, які свідчать про несприятливі умови водного середовища в урбанізованій ділянці та сприятливі умови існування в рекреаційній ділянці.

1. Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M. et al. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Amer. J. Physiol. – 1999. – No 277. – P. 1612–1619.
2. Serafim M. A., Bebianno M. J. Variation of metallothionein and metal concentration in the digestive gland of clam *Ruditapes decussates*: sex and seasonal effects // Environ. Tox. Chem. – 2001. – 20, No 3. – P. 544–552.
3. Стадниченко А. П. Перлівницеви. Кулькові (Unionidae, Cycladidae) // Фауна України. – Київ: Наук. думка, 1984. – Т. 29. – С. 50–53.
4. Domouhtsidou G. P., Dailianis S., Kaloyianni M., Dimitriadis V. K. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers. Combination with trace metal concentrations // Mar. Pollut. Bull. – 2004. – 48, No 5–6. – P. 572–586.
5. Nasci C., Nesto N., Monteduro R. A., Da Ros L. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy) // Mar. Environ. Res. – 2002. – 54, No 3–5. – P. 811–816.
6. Kagi J. H. R., Schaffer A. Biochemistry of metallothionein // Biochemistry. – 1988. – 27, No 23. – P. 8509–8515.
7. Dallinger R., Egg M., Köck G., Hofer R. The role of metallothionein in cadmium accumulation of *Arctic chair* (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes // Aquat. Toxicol. – 1997. – 38, No 1–3. – P. 47–66.
8. Brouwer M., Enghild J., Hoexum-Brouwer T. et al. Primary structure and tissue-specific expression of blue crab (*Callinectes sapidus*) metallothionein isoforms // Biochem. J. – 1995. – No 311. – P. 617–622.
9. Stolyar O. B., Myhayliv R. L., Mischuk O. V. The concentration-specific response of metallothioneins in copper-loading freshwater bivalve *Anodonta cygnea* // Ukr. Bioc. J. – 2005. – 77, No 6. – P. 65–69.
10. Столяр О. Б., Фальфушинская Г. И., Базан О. Г. Сезонные особенности свойств металлотинеинов пресноводного двустворчатого моллюска *Colletopterum pictinale* (Unionidae) // Гидробиол. журн. – 2007. – № 6. – С. 98–108.
11. Мищук О. В., Голонговська Л. О., Прийдун Х. Б., Столяр О. Б. Вплив переселення молюсків на стан їх системи антиоксидантного захисту та металотіонеїнів // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2007. – № 1(31). – С. 171–177.
12. Hamza-Chaffai A., Amiard J. C., Pellerin J. et al. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure // Comp. Biochem. and Physiol. – 2000. – 127, No 2(C). – P. 185–197.
13. Лукашев Д. В. Мониторинг загрязнения тяжелыми металлами экосистемы Днепра в пределах г. Киева с помощью пресноводных моллюсков // Гидробиол. журн. – 2006. – 42, № 1. – С. 86–98.
14. Столяр О. Б., Грубинко В. В., Мыхайлив Р. Л., Мищук Е. В. Влияние условий существования на связывание тяжелых металлов и окислительную деструкцию биомолекул в тканях пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* // Там же. – 2003. – 39, № 6. – С. 73–82.
15. Брень Н. В., Домашлинец В. Г. Беспозвоночные как биомониторы полиметаллического загрязнения донных отложений // Там же. – 1998. – 34, № 5. – С. 80–93.