

БІОХІМІЯ

УДК 577.352.38:577.64

**СПЕКТРАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ  
КАРАСЯ *CARASSIUS AURATUS* ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ БІОМАРКЕР  
ЗАБРУДНЕННЯ СЕРЕДОВИЩА**

**Г. Фальфушинська<sup>1</sup>, Л. Гнагишина<sup>1</sup>, О. Турта<sup>1</sup>, О. Осадчук<sup>1</sup>,  
М. Касянчук<sup>2</sup>, О. Столяр<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Тернопільський національний педагогічний університет  
імені Володимира Гнатюка*

*НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна*

<sup>2</sup>*Тернопільський національний економічний університет  
вул. Львівська, 11, Тернопіль 46004, Україна*

*e-mail: halynka.f@gmail.com*

Порівнювали спектральні характеристики та вміст металів у ізоформах металотіонеїнів (МТ) печінки і зябер карася *Carassius auratus* із чистої (З) та забрудненої (Б) водойми за дії на організм іонів міді та марганцю, а також хлорорганічного і дитіокарбаматного пестицидів (кожного у двох концентраціях) протягом 14 діб. Встановлено відмінності цих характеристик між представниками двох популяцій і їхні зміни за дії на організм досліджуваних чинників, особливо істотні у групі Б, пов'язані зі зменшенням металозв'язувальної здатності МТ, особливо в зябрах. За допомогою канонічного аналізу доведено спільні ознаки УФ-спектрів у риб, що зазнають природного комплексного забруднення та модельної дії пестицидів.

*Ключові слова:* металотіонеїни, карась, спектральні властивості, важкі метали, пестициди.

Металотіонеїни (МТ) – надродина низькомолекулярних, внутрішньоклітинних термостабільних, високоафінних до іонів d-металів сульфурвмісних білків, ідентифікованих у широкого кола організмів, від бактерій до ссавців [5, 12, 16, 18]. МТ проявляють функціональну плейотропію, беручи участь у різних фізіологічних і патологічних процесах, зокрема в метаболізмі есенціальних металів, секвестрації токсичних металів, знешкодженні активних форм кисню, проліферації та диференціації клітин, розвитку пухлин [12, 16, 18] тощо, причому нерідко ці функції виконуються різними ізоформами, які характеризуються структурними та функціональними особливостями [5, 13].

Широке коло забруднювачів (іони металів, прооксиданти різної природи) посилюють експресію МТ [5, 7, 18], **через що МТ вважаються перспективними біомаркерами якості оточуючого середовища**, зокрема водного [16, 18]. Поряд із тим, у сильно забрудненому середовищі вміст і експресія МТ у тканинах тварин можуть зменшуватися [15], у зв'язку з чим виникає необхідність пошуку характеристик МТ, за якими можна селективно оцінити природу кількісних змін цих білків за дії забруднення.

Відомо, що спектральні властивості МТ залежать від природи і співвідношення вмісту металів у складі цих білків [13, 16]. Нами було показано, що спектральні властивості ізоформ МТ моллюска відображають специфіку забруднення водного середовища сполуками міді та цинку [3], що може бути використано у біоіндикації. Проте МТ моллюска представле-

ні різноманітними видоспецифічними формами [4, 17], що ускладнює інтерпретацію даних. Тому метою нашої роботи стало з'ясувати здатність спектральних характеристик типових МТ хребетних тварин, яким не властива така гетерогенність: реагувати на тривалі та короткодійні пошкоджувальні чинники. Досвід таких досліджень обмежений [2]. Як індикаторний вид ми обрали срібного карася *Carassius auratus*, який має високу екологічну пластичність, виняткову резистентність до дії ряду забруднювальних речовин [9], низку унікальних морфологічних і біохімічних пристосувань у зябрах і печінці та широко використовується в лабораторному експерименті [14]. Як модельні чинники були обрані іони міді та марганцю, які є типовими забруднювачами водойм Західної України [9], та пестициди Аполло і ТАТТУ, широко використовувані у регіоні, дія яких на біоту вивчена недостатньо [www.inchem.org].

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на дорослих особинах сріблястого карася, родина Коропових (*Carassius auratus gibelio*). Екземпляри відбирали із двох місцевостей: рибогосподарські ставки в урочищі Залізці у верхів'ї ріки Серет (умовно чиста місцевість) і став у нижній течії ріки Нічлава, нижче м. Боршів, у якому не працюють очисні споруди, в районі відносно високої аграрної активності (забруднена місцевість). Екземпляри карася відбирали траловим методом і доставляли в лабораторію, де вони були адаптовані до лабораторних умов протягом 7 діб. Експериментальні умови створювали в басейнах об'ємом 200 л з кількістю риб із розрахунку 1 особина на 40 л води. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 7,0–8,0 мг/л, вуглекислого газу – 2,2–2,8 мг/л, рН – 7,6–8,0. Воду відстоювали і змінювали щодві доби, поновлюючи в експериментальних групах вміст досліджуваних сполук у воді. Температура води коливалась у межах 15–18°C залежно від сезону. Тварин годували комерційним кормом.

З відібраних із кожної водойми риб формували три групи для вивчення впливу кожного металу та пестициду – одна контрольна, іншим у воду додавали сіль металу або пестицид. Вміст міді ( $\text{Cu}^{2+}$  у вигляді  $\text{CuSO}_4$ ) становив 0,005 (Cu1) та 0,05 мг/л (Cu2). Вміст марганцю ( $\text{Mn}^{2+}$  у вигляді  $\text{MnCl}_2$ ) становив 0,17 (Mn1) та 1,7 мг/л (Mn2). Вміст хлороорганічного пестициду Аполло (діюча речовина клофентезин) становив 0,002 (A1) та 0,01 мг/л (A2). Вміст дитіокарбаматного пестициду ТАТТУ (діючі речовини манкоцеб і пропамокарб) становив 0,0091 (T1) та 0,091 мг/л (T2). Вміст металу у воді створювали додаванням відповідної солі фірми “Реахим” кваліфікації “хч” і контролювали за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії. Досліджувана концентрація металів була близькою або нижчою, ніж їхній середній вміст у прісних водоймах України [9]. Інкубація риб у досліджуваних розчинах сполук тривала 14 діб, що вважається оптимальним терміном для акліматизації.

Експерименти на тваринах проводили у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). Тварин умертвляли під ефірним наркозом, вимірювали (з точністю до мм) і зважували (з точністю до мг). Печінку і зябра відокремлювали, осушували фільтрувальним папером і зважували. Усі процедури по відбору і обробці тканин проводили на холоді. Всі реактиви, крім перелічених нижче, були фірми “Реахим” кваліфікації “хч”.

МТ виділяли шляхом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі з термостабільного екстракту тканин карася, як було описано раніше [9]. Для дослідження використовували печінку і зябра карася. Розчин термостабільних білків одержували з 5%-го гомогенату тканини в 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0 з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу (“Sigma”) для запобігання окисненню SH-груп та інгібітора протеаз фенілметилсульфо-

нілфториду (0,1 мМ, "Sigma"). МТ ідентифікували як фракцію термостабільних білків із максимальним співвідношенням  $D_{254}/D_{280}$  [12]. Вимірювали УФ-спектри та вміст металів у об'єднаному елюаті окремих форм МТ (в об'ємі 15 мл).

Вміст міді та цинку в ізоформах МТ вимірювали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса : об'єм) на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115 і виражали в мкг на г сирової маси тканини.

Результати визначення показників МТ подано як усереднені значення двох-трьох вимірювань на об'єднаних із 6 тварин зразках матеріалу. **Кореляційний аналіз взаємозалежності диференційних спектрів МТ, множинний регресійний і дисперсійний аналізи вмісту металів у ізоформах МТ і показників світлопоглинання** проводили з використанням пакетів програм Statistica v 7.0.

### Результати і їхнє обговорення

Термостабільні білки тканин карася при іонообмінній хроматографії утворюють дві головні ізоформи (рис. 1, А), ідентифіковані як МТ-1 і МТ-2 згідно з порядком виходу та відповідають профілю елюції стандартного МТ кролика. МТ-1 елюється при 0,24–0,25 М NaCl, а МТ-2 при 0,39–0,40 М NaCl. У більшості випадків наявність додаткової фракції МТ-2а є проявом мікрогетерогенності ізоформ тваринних МТ [19].

У спектрах ізоформ МТ проявляються характерні ознаки для цих білків: максимум поглинання для МТ-1 - при 220–240 нм, а для МТ-2а/2 – при 230–240 нм і відсутність максимуму при 280 нм, що вказує на відсутність у їхньому складі ароматичних амінокислотних залишків [12].

Головним металом у складів ізоформ МТ карася виявляється цинк (табл. 1), йому і відповідає «блакитне зміщення» максимуму поглинання, типового для кадмій-тіолатних комплексів, індукованих кадмієм МТ [8]. Однак значна частка вмісту металів припадає також на мідь, особливо у МТ-2а/2. Металозв'язувальна здатність МТ-1 тканин карася Б-групи нижча, а МТ-2а/2 – співрозмірна або вища, ніж у групі порівняння. Вміст цинку та міді у МТ-1 тканин за дії пошкоджувальних чинників зменшується особливо помітно у тварин 3-групи та, меншою мірою, Б-групи, за окремими винятками. У МТ-2 карася за експериментальних умов вміст металів також зменшується або залишається в межах контролю. Виняток становить 2–9-кратне збільшення вмісту цинку в МТ печінки тварин 3-групи та у Б-групи – за дії ТАТТУ.

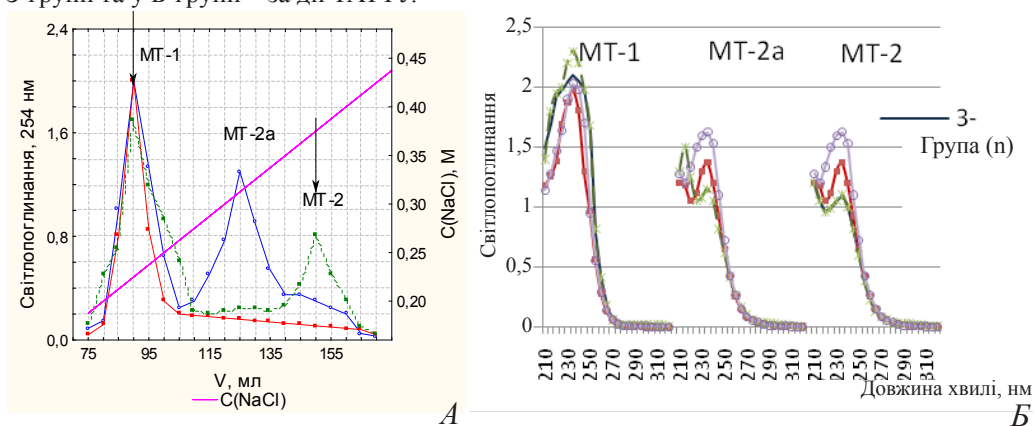


Рис. 1. Типові профілі елюції (А) та УФ-спектри (Б) металотіонеїнів печінки (п) та зябер (з) карася, одержаних при іонообмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl в 0,01 М трис-НСl буфері, рН 8,0.

У інтактних тварин 3-групи співвідношення Zn : Cu вище в МТ-1, ніж в МТ-2а/2 (табл. 1, 2). Дія іонів металів зумовлює збільшення частки цинку в МТ-1 тканин карася Б-, та, особливо, на порядок, 3-групи, а біоцидів – до її зменшення, за окремими винятками. Зміни цього показника в МТ-2а/2 тканин карася за дії досліджуваних чинників залежали від вихідних умов існування організму. У печінці вони були протилежними, - в експериментальних умовах частка цинку збільшувалась у тварин 3-групи та зменшувалась у тварин Б-групи, а у зябрах однозначної закономірності виявлено не було.

Обчислення характерних для МТ співвідношень показників світлопоглинання [2, 3] свідчить (табл. 2), що для МТ карасів Б-групи в контролі властивий вищий показник  $D_{245}/D_{295}$  і нижчий  $D_{260}/D_{230}$  в обох тканинах, ніж у групі порівняння. Дія пошкоджувальних чинників викликала зміни показників, які відображають стан тілових груп у білку, зменшення співвідношення  $D_{254}/D_{280}$  та  $D_{245}/D_{295}$  у тварин обох досліджуваних популяцій, більш істотні у тварин Б-групи та за дії пестицидів. В окремих випадках нами було зареєстровано зростання показників, які характеризують зв'язування металів у тіюлатні кластери ( $D_{215}/D_{230}$  та  $D_{260}/D_{230}$ ), однак загальної закономірності ми не виявили.

МТ водних тварин вважаються перспективними біомаркерами якості водного оточення [5, 16]. Однак у зв'язку з різноманітністю підходів до аналізу МТ, для них, на відміну від інших показників, включених у світові програми біомоніторингу, не розроблені методологічні стандарти визначення і трактування біологічної реакції [10]. Дія низьких або високих концентрацій металів може не викликати біологічного відгуку МТ [16, 18], або й навіть зумовлювати пригнічення їх синтезу [15], а для забруднювачів органічної природи індукція синтезу МТ доведена лише у випадку кількох високотоксичних сполук [7, 16, 18]. Згідно з результатами статистичної обробки спектральні показники МТ карасів із польових умов об'єднуються в одну групу з такими за модельного впливу пестицидів, особливо у тканині зябер. Поряд із цим, їх стан за дії металів відрізняється від характеристик у природних умовах існування. Даний факт, на нашу думку, відображає специфіку забруднення

Таблиця 1

Вміст міді та цинку (мкг/г тканини) і їхнє співвідношення в ізоформах металотіонеїнів печінки карася в польових умовах і за дії модельних токсикантів,  $M \pm m$ ,  $n=8$

Метал	МТ-1		МТ-2а/2		МТ-1		МТ-2а/2	
	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б
	Польові умови				Контроль			
Cu	0,49±0,05	0,31±0,03 <sup>a</sup>	0,80±0,07	0,64±0,06 <sup>a</sup>	0,50±0,04	0,31±0,03 <sup>a</sup>	0,40±0,04	0,46±0,05
Zn	6,0±0,5	3,4±0,4 <sup>a</sup>	1,0±0,1	1,9±0,2 <sup>a</sup>	6,0±0,6	2,7±0,3 <sup>a</sup>	0,5±0,1	2,3±0,2 <sup>a</sup>
Zn:Cu	12,2±1,2	11,0±1,2	1,3±0,1	3,0±0,3 <sup>a</sup>	12,1±1,7	8,7±0,9 <sup>a</sup>	1,0±0,1	5,0±0,5 <sup>a</sup>
	Cu1				Cu2			
Cu	0,10±0,01 <sup>b</sup>	0,28±0,03	0,91±0,08 <sup>b</sup>	0,63±0,06 <sup>b</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,15±0,01 <sup>b</sup>	0,20±0,02 <sup>b</sup>	0,28±0,03 <sup>b</sup>
Zn	5,0±0,5	2,0±0,2	4,4±0,04	0,7±0,1	4,5±0,5 <sup>b</sup>	1,7±0,2 <sup>b</sup>	1,1±0,1 <sup>b</sup>	0,6±0,1 <sup>b</sup>
Zn:Cu	50,2±4,8 <sup>b</sup>	7,1±0,7 <sup>b</sup>	4,9±0,5 <sup>b</sup>	1,1±0,1 <sup>b</sup>	4500±92 <sup>b</sup>	11,3±1,1 <sup>b</sup>	5,5±0,4 <sup>b</sup>	2,1±0,2 <sup>b</sup>
	Mn1				Mn2			
Cu	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,24±0,02 <sup>b</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	1,41±0,11 <sup>b</sup>	0,10±0,01 <sup>b</sup>	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,50±0,05 <sup>b</sup>	0,41±0,04
Zn	4,8±0,4 <sup>b</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>	4,8±0,4 <sup>b</sup>	0,4±0,0 <sup>b</sup>	6,3±0,6	1,2±0,1 <sup>b</sup>	1,4±0,1 <sup>b</sup>	1,0±0,1 <sup>b</sup>
Zn:Cu	4800±98 <sup>b</sup>	5,8±0,6 <sup>b</sup>	4800±98 <sup>b</sup>	2,2±0,2 <sup>b</sup>	63,2±5,8 <sup>b</sup>	17,1±1,8 <sup>b</sup>	2,8±0,3 <sup>b</sup>	2,4±0,2 <sup>b</sup>
	A1				A2			
Cu	0,11±0,01 <sup>b</sup>	0,68±0,07 <sup>b</sup>	0,44±0,04	0,58±0,06 <sup>b</sup>	0,16±0,01 <sup>b</sup>	0,65±0,07 <sup>b</sup>	0,30±0,03 <sup>b</sup>	0,53±0,05 <sup>b</sup>
Zn	0,5±0,1 <sup>b</sup>	3,0±0,3	4,2±0,4 <sup>b</sup>	2,3±0,2	1,4±0,1 <sup>b</sup>	1,8±0,2 <sup>b</sup>	0,8±0,1 <sup>b</sup>	1,5±0,2 <sup>b</sup>
Zn:Cu	4,5±0,4 <sup>b</sup>	4,4±0,4 <sup>b</sup>	9,5±1,0 <sup>b</sup>	4,0±0,4 <sup>b</sup>	8,8±0,9 <sup>b</sup>	2,8±0,3 <sup>b</sup>	2,7±0,3 <sup>b</sup>	2,8±0,3 <sup>b</sup>
	T1				T2			
Cu	0,24±0,02 <sup>b</sup>	0,28±0,02	0,49±0,05 <sup>b</sup>	0,31±0,03 <sup>b</sup>	0,28±0,03 <sup>b</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup>	0,22±0,02 <sup>b</sup>	0,42±0,04
Zn	1,5±0,2 <sup>b</sup>	2,7±0,3	1,9±0,2 <sup>b</sup>	2,8±0,2 <sup>b</sup>	1,4±0,2 <sup>b</sup>	2,8±0,3	1,7±0,2 <sup>b</sup>	2,6±0,3
Zn:Cu	6,3±0,6	9,6±1,0	3,9±0,4	9,0±0,8	5,1±0,5 <sup>b</sup>	9,3±0,8	7,7±0,8 <sup>b</sup>	5,2±0,5

Таблиця 2

Вміст міді та цинку (мкг/г тканини) і їхнє співвідношення в ізоформах металотіонеїнів зябер карася в польових умовах і за дії модельних токсикантів,  $M \pm m, n=8$

Метал	MT-1		MT-2a/2		MT-1		MT-2a/2	
	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б
	Польові умови				Контроль			
Cu	0,36±0,03	0,22±0,02 <sup>a</sup>	0,82±0,08	0,95±0,10 <sup>a</sup>	0,41±0,04	0,28±0,03 <sup>a</sup>	0,70±0,06	0,44±0,04 <sup>a</sup>
Zn	4,7±0,4	0,5±0,1 <sup>a</sup>	1,0±0,1	3,0±0,3 <sup>a</sup>	5,6±0,5	2,0±0,2 <sup>a</sup>	2,0±0,2	2,0±0,2
Zn:Cu	13,0±1,3	2,3±0,2 <sup>a</sup>	1,2±0,1	3,2±0,3 <sup>a</sup>	14,0±1,3	7,1±0,8 <sup>a</sup>	2,9±0,3	4,5±0,4 <sup>a</sup>
	Cu1				Cu2			
Cu	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,28±0,03	0,30±0,03 <sup>b</sup>	X	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,27±0,03	1,20±0,18 <sup>b</sup>	0,41±0,04
Zn	6,7±0,7 <sup>b</sup>	1,2±0,1 <sup>b</sup>	1,2±0,1 <sup>b</sup>	X	6,8±0,7 <sup>b</sup>	2,1±0,2	1,2±0,2 <sup>b</sup>	1,6±0,2 <sup>b</sup>
Zn:Cu	6700±89 <sup>b</sup>	4,3±0,4 <sup>b</sup>	4,0±0,4 <sup>b</sup>	X	6800±97 <sup>b</sup>	7,8±0,8	1,0±0,1 <sup>b</sup>	3,9±0,4 <sup>b</sup>
	Mn1				Mn2			
Cu	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,13±0,01 <sup>b</sup>	X	0,21±0,02 <sup>b</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,15±0,01 <sup>b</sup>	0,20±0,02 <sup>b</sup>	X
Zn	3,6±0,4 <sup>b</sup>	1,6±0,2 <sup>b</sup>	X	1,3±0,1 <sup>b</sup>	4,2±0,4 <sup>b</sup>	2,1±0,2	1,4±0,1 <sup>b</sup>	X
Zn:Cu	3600±76 <sup>b</sup>	12,3±1,2 <sup>b</sup>	X	6,5±0,7 <sup>b</sup>	4200±86 <sup>b</sup>	14,0±1,4 <sup>b</sup>	7,0±0,7 <sup>b</sup>	X
	A1				A2			
Cu	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,60±0,06 <sup>b</sup>	X	0,34±0,03 <sup>b</sup>	0,19±0,02 <sup>b</sup>	0,08±0,01 <sup>b</sup>	0,22±0,02 <sup>b</sup>	0,51±0,05 <sup>b</sup>
Zn	2,3±0,2 <sup>b</sup>	2,3±0,2	X	2,1±0,1	1,0±0,1 <sup>b</sup>	2,0±0,2	1,2±0,1 <sup>b</sup>	1,5±0,1 <sup>b</sup>
Zn:Cu	14,4±1,5	3,9±0,4 <sup>b</sup>	X	6,2±0,6 <sup>b</sup>	5,3±0,5 <sup>b</sup>	22,5±2,1 <sup>b</sup>	5,5±0,5 <sup>b</sup>	3,0±0,3 <sup>b</sup>
	T1				T2			
Cu	0,35±0,03 <sup>b</sup>	0,28±0,02	0,32±0,03 <sup>b</sup>	0,37±0,04 <sup>b</sup>	0,22±0,02 <sup>b</sup>	0,25±0,03	0,34±0,03 <sup>b</sup>	0,42±0,04
Zn	2,3±0,2 <sup>b</sup>	3,5±0,4 <sup>b</sup>	1,4±0,1 <sup>b</sup>	3,7±0,4 <sup>b</sup>	1,4±0,1 <sup>b</sup>	3,0±0,3 <sup>b</sup>	1,5±0,1 <sup>b</sup>	3,6±0,3 <sup>b</sup>
Zn:Cu	6,6±0,7 <sup>b</sup>	12,5±0,9 <sup>b</sup>	4,4±0,3 <sup>b</sup>	10,0±1,0 <sup>b</sup>	6,4±0,6 <sup>b</sup>	12,0±1,2 <sup>b</sup>	4,4±0,4 <sup>b</sup>	8,6±0,7 <sup>b</sup>

Примітка. X – фракція відсутня.

Таблиця 3

Співвідношення показників світлопоглинання металотіонеїнів тканин карася в польових умовах і за дії модельних токсикантів

Показник, довжини хвилі	MT-1		MT-2a/2		MT-1		MT-2a/2		MT-1		MT-2a/2		MT-1		MT-2a/2	
	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б
	Печінка				Зябра				Печінка				Зябра			
	Польові умови								Контроль							
215/230	0,9	0,8	2,1	0,6	0,9	0,8	2,8	1,5	0,8	0,7	1,0	0,9	0,8	0,7	1,2	0,8
260/230	0,24	0,16	0,11	0,20	0,19	0,17	0,14	0,38	0,21	0,15	0,21	0,19	0,19	0,15	0,23	0,16
254/280	25,0	6,2	2,6	5,6	20,7	21,0	2,0	4,1	43,3	46,7	10,8	13,4	43,2	55,0	10,6	10,6
245/295	105	23,4	13,7	15,2	62,5	162	5,8	15,9	165	325	35,7	77,5	124	425	34,2	138
	Cu1				Cu2				Cu1				Cu2			
215/230	0,8	0,7	2,7	2,1	0,8	0,7	1,1	X	0,6	0,6	1,3	0,7	0,7	0,6	1,0	0,7
260/230	0,18	0,15	1,21	0,56	0,18	0,14	0,22	X	0,16	0,06	0,35	0,15	0,15	0,13	0,20	0,17
254/280	45,3	53,3	5,4	4,2	32,3	15,6	5,7	X	44,2	13,0	7,1	10,5	59,4	29,4	13,1	6,3
245/295	211	211	26,7	16,5	132	72,0	28,1	X	156	188	18,0	75,4	237	167	46,3	36,9
	Mn1				Mn2				Mn1				Mn2			
215/230	1,0	0,5	1,1	3,0	0,9	0,7	X	1,6	0,7	0,6	0,9	2,1	0,7	0,7	1,1	X
260/230	0,48	0,11	0,28	1,31	0,26	0,13	X	0,50	0,18	0,11	0,25	0,14	0,18	0,11	0,25	X
254/280	56,0	14,1	8,4	2,9	68,3	6,8	X	3,3	39,3	42,0	10,1	3,9	39,4	6,4	11,4	X
245/295	106	57,9	21,1	5,9	177	27,9	X	10,4	167	171	40,5	43,6	160	37,5	43,9	X
	A1				A2				A1				A2			
215/230	0,8	0,6	0,8	1,4	0,7	0,7	X	1,0	0,8	0,7	1,3	2,9	0,8	0,5	1,5	1,6
260/230	0,16	0,13	0,15	0,53	0,19	0,14	X	0,25	0,15	0,17	0,33	1,34	0,13	0,15	0,30	0,38
254/280	22,2	21,8	15,3	4,5	8,7	72,5	X	4,5	33,3	9,5	10,4	3,0	13,1	14,3	4,5	4,0
245/295	103	156	69,9	19,4	55,0	366	X	16,7	127	50,0	71,0	8,5	57,2	73,3	32,0	11,8
	T1				T2				T1				T2			
215/230	2,3	1,1	0,7	4,2	0,9	0,7	1,3	1,7	0,7	0,7	1,3	2,9	0,6	0,7	1,3	1,3
260/230	1,18	0,21	0,17	0,84	0,20	0,15	0,25	0,47	0,14	0,15	0,31	1,09	0,16	0,14	0,25	0,22
254/280	1,9	16,3	16,3	4,0	7,8	28,5	7,4	3,7	23,4	60,0	6,1	3,4	18,9	18,8	7,4	19,2
245/295	3,3	102	75,0	14,7	33,7	111	21,1	11,1	94,1	215	15,5	19,7	77,8	90,0	21,1	74,0

аграрного регіону саме забруднювачами органічної природи та дає змогу рекомендувати спектральні показники ізоформ МТ зябер карася для попередньої оцінки забруднення водойм сполуками органічної природи в екологічних концентраціях.

Як відомо, спектральні властивості реконструйованих МТ залежать від складу їх металів [3, 8, 13]. При аналізі метал-депонуючої здатності МТ слід також враховувати конкуренцію між металами за зв'язування у тіолоатні кластери. Згідно з отриманими нами результатами, дія металів викликала збільшення частки цинку, а пестицидів – міді у тварин обох дослідних груп. Згідно з рядом спорідненості металів до зв'язування з МТ в метал-тіолоатні кластери, мідь проявляє вищу афінність, ніж цинк [12, 18]. Однак за дії металів дана закономірність не справджується. Очевидно, це пов'язано з порушенням функціонування метал-транспортних систем організму внаслідок некрозу й апоптозу хлоридних і респіраторних клітин зябер [14], а також структури акцепторів металів у клітинах. Подібні закономірності спостерігалися нами як зменшення вмісту цинку та міді у коропа з забрудненої водойми [9].

За умов часткового окиснення білка утворення дисульфідних зшивок і переходу кластерної структури МТ до неупорядкованої спіральної конформації [17] спостерігається поява смуги в ділянці ближнього УФ (~290 нм). Як було показано на прикладі молюска та жаби, дія природного комплексного забруднення та надлишок Фентон-металів у складі термостабільних білків тканини посилює окисну нестабільність і викликає часткове окиснення тіолових груп МТ [1, 3]. Як видно з одержаних нами результатів, у тварин 3-групи та, особливо, забрудненої Б-групи дія металів, пестицидів і природного комплексного забруднення веде до зменшення показника  $D_{245}/D_{295}$  (рис. 3), а отже, й до деструктивних змін, які в подальшому можуть спричинити втрату білком специфічної здатності зв'язувати метали у нетоксичні для клітини комплекси, внаслідок утворення дисульфідних зшивок [6, 11, 17]. Кореляційних зв'язків між вмістом міді у МТ й оптичним показником у тканинах карася нами виявлено не було.

Виходячи із відомостей про детоксикаційну функцію печінки та бар'єрну функцію зябер щодо металів і пестицидів, можна було б очікувати, що дія пошкоджувальних чинників приведе до збільшення вмісту міді та цинку у складі метал-депонуючих білків МТ. Однак такої залежності нами зареєстровано не було, позаяк вміст есенціальних металів у

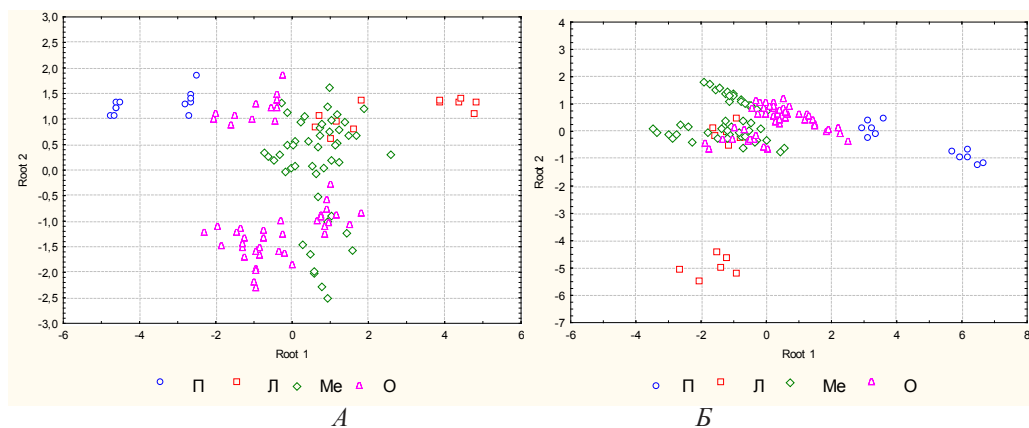


Рис. 2. Розподіл груп тварин за результатами обробки спектральних показників світлопоглинання металотіонеїнів печінки (А) та зябер (Б) методом канонічного аналізу: П – польові умови, Л – інтактні тварини, Me – дія металів, О – дія пестицидів.

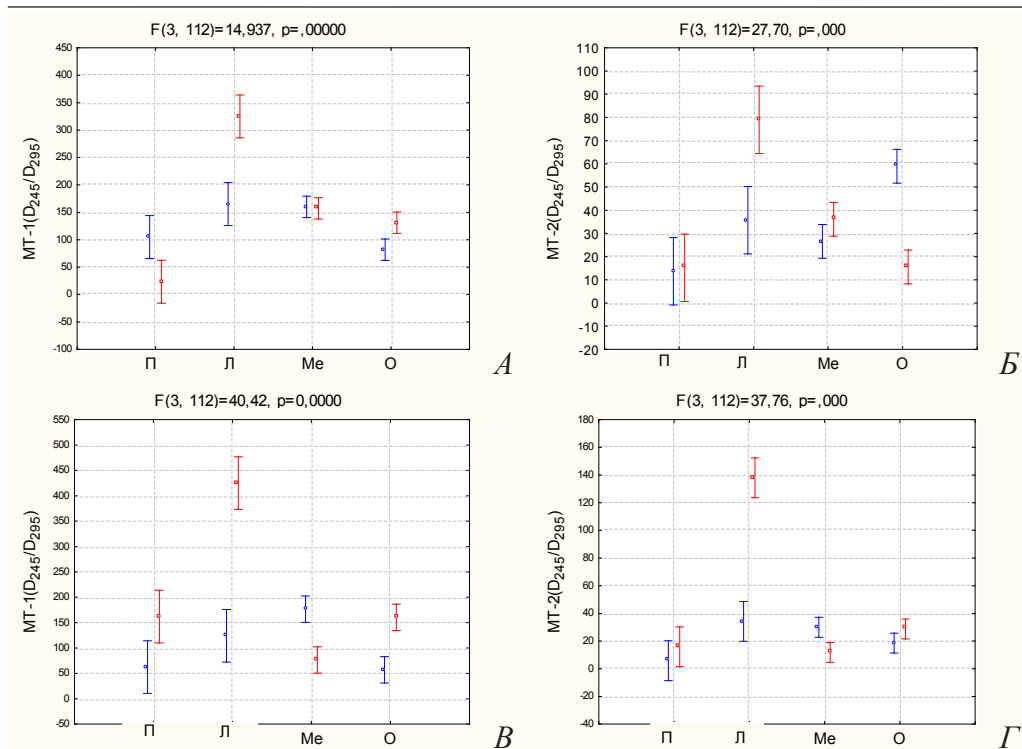


Рис. 3. Залежність оптичного показника  $D_{245}/D_{295}$  у печінці (А, В) та зябрах (В, Г) карася залежно від умов існування.

МТ зменшувався, особливо у зябрах тварин 3-групи та печінці тварин Б-групи. Це відповідає літературним даним щодо обмеження акумуляції токсикантів у сильно забруднених водоймах та/або за дії високих концентрації токсикантів у рибу за рахунок їх підвищеної екскреції та ослизнення зябер [4, 10, 14]. Таким чином, зменшення металозв'язувальної здатності МТ тканин карася можна розглядати як прояв адаптації до дії додаткового пошкоджувального чинника. Тіолові групи МТ, які не беруть участі у зв'язуванні металів у нетоксичні комплекси, можуть включатися в антиоксидантний захист як «уловлювачі» активних форм кисню [5, 18]. Наведенні міркування узгоджуються з появою ознак часткового окиснення тіолових груп МТ за дії на організм спектра досліджуваних токсикантів і природного забруднення.

Відомо, що титрування апотіонеїнів кролика, телячої печінки та мозку, а також людини іонами цинку та купруму в умовах *in vitro* зумовлює появу смуг поглинання в реконструйованих МТ при 220-240 нм («блакитне зміщення») та близько 250/360 нм як наслідок іонообмінних переходів новоутворених Cys-Zn(II) та Cys-Cu(I) тіолатних кластерів [7, 11, 13, 17]. Нами також було знайдено залежність між показниками світлопоглинання у зябрах, які відображають стан метал-тіолатних кластерів, і зв'язаними з ними металами, що описується регресійними рівняннями:

$$MT-1(D_{215}/D_{230}) = 0,631 + 0,156 \times MT-1(Cu)^* + 0,022 \times MT-1(Zn)^*, R^2 = 0,14, F(2,117) = 9,7$$

$$MT-1(D_{260}/D_{230}) = 0,143 - 0,012 \times MT-1(Cu) + 0,007 \times MT-1(Zn)^*, R^2 = 0,14, F(2,117) = 9,5$$

$$MT-2(D_{215}/D_{230}) = 0,391 + 0,889 \times MT-2(Cu)^* + 0,229 \times MT-2(Zn)^*, R^2 = 0,43, F(2,117) = 43,6$$

$$MT-2(D_{260}/D_{230}) = 0,076 + 0,021 \times MT-2(Cu) + 0,091 \times MT-2(Zn)^*, R^2 = 0,47, F(2,117) = 52,9$$

Як бачимо, детермінантою змін оптичних показників  $D_{215}/D_{230}$  та  $D_{260}/D_{230}$  в ізоформах МТ є вміст цинку, а  $D_{215}/D_{230}$  – ще й міді, що відповідає теоретичним уявленням щодо накладання амідних, Суs-Zn(II) та, частково, Суs-Cu(I) електронних переходів [7, 11, 13] у ділянці 200–240 нм у спектрах МТ хребетних. Узгодження між змінами показника  $D_{260}/D_{230}$ , який насамперед описує стан купрум-тіолатних кластерів і вмістом міді у складі ізоформ МТ не відзначено. Очевидно, це пов'язано з філогенетичними особливостями доменної організації МТ карася та порівняно невисокою часткою міді у їхньому складі, особливо в МТ-1 (співвідношення Zn:Cu ~ 12), що узгоджується з попередньо наведеними міркуваннями.

Таким чином, спектральні показники зябер карася більш чутливо реагують на дію пошкоджувальних чинників, ніж показники печінки. У тварин 3- та, особливо, Б-групи дія металів і пестицидів викликає зміни спектра ізоформ МТ, пов'язані з деструкцією унікальних тіолатних кластерів та/або з тіол-дисульфідними переходами і зменшення металозв'язувальної здатності МТ. Зміна оптичних показників  $D_{215}/D_{230}$  та  $D_{260}/D_{230}$  відбувається узгоджено зі змінами вмісту цинку в ізоформах МТ. Зважаючи на подібність спектральних характеристик МТ у тварин в польових умовах і за дії пестицидів вважаємо за доцільне використовувати відносно малозатратний спосіб спектрального аналізу ізоформ МТ зябер карася для попередньої оцінки ступеня комплексного природного забруднення водойм в аграрних регіонах.

*Робота виконана за підтримки МОН України в межах Спільної Українсько-Корейської та Українсько-Індійської НДР (№ М/256-2008 та № М/567-2009), а також Західно-Українського Біомедичного Центру.*

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Романчук Л. Д., Фальфушинська Г. І., Зарічна О. В. та ін. Спектральні властивості металотіонеїнів і розподіл редокс-активних металів у тканинах жаби залежно від місця вилову та сезону // *Наук. зап. Тернопіль. пед. ун-ту. Сер. біол.* 2006. № 3–4 (30). С. 140–147.
2. Столяр О., Курант В., Грубінко В., Горбовий П. УФ-спектроскопія та високоефективна рідинна хроматографія в аналізі металотіонеїнів гепатопанкреасу коропа при дії йонів важких металів // *Фізичний збірник НТШ.* 2001. Т. 4. С. 423–429.
3. Фальфушинська Г. І., Гнатишина Л. Л., Касянчук М. М., Столяр О. Б. Спектральні показники ізоформ металотіонеїнів молюска як біохімічні маркери раннього виявлення природного забруднення // *Природничий альманах.* 2009. Т. 29. С. 258–266.
4. Banni M., Dondero F., Jebali J. et al. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein *mt10* and *mt20* expression: a validation along the Tunisian coast // *Biomarkers.* 2007. Vol. 12. N 4. P. 369–383.
5. Blindauer C. A., Leszczyszyn O. I. Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more // *Nat. Prod. Rep.* 2010. Vol. 27. N5. P. 720–741.
6. Chen P., Onana P., Shaw C. F., Petering D. H. Characterization of calf liver Cu,Zn-metallothionein: naturally variable Cu and Zn stoichiometries // *Biochem. J.* 1996. Vol. 317. P. 389–394.
7. Dallinger R., Chabicoovsky M., Berger B. Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. I. Molecular, biochemical and methodical background // *Environ. Toxicol. Chem.* 2004. Vol. 23. N 4. P. 890–901.
8. Dallinger R., Wang Y., Berger B. et al. Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia* // *Eur. J. Biochem.* 2001. Vol. 268. №15. P. 4126–4133.
9. Falfushynska H., Gnatyshyna L., Priyden C. et al. Variability of responses in the crucian



- carp *Carassius carassius* from two Ukrainian ponds determined by multi-marker approach // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010. Vol. 73. N 8. P. 1896–1906.
10. Handy R. D., Galloway T. S., Depledge M. H. A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology // *Ecotoxicol.* 2003. Vol. 12. N 1–4. P. 331–343.
  11. Jiang L.-J., Vasak M., Vallee B. L., Maret W. Zinc transfer potentials of the a- and b-clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule // *PNAS.* 2000. Vol. 97. N 6. P. 2503–2508.
  12. Kagi J. H. R., Schaffner A. Biochemistry of metallothionein // *Biochem.* 1988. Vol. 27. N 23. P. 8509–8515.
  13. M $\ddot{u}$ nger K., Germann U. A., Beltramini M. et al. (Cu,Zn)-Metallothioneins from Fetal Bovine Liver. Chemical and spectroscopic properties // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. N 18. P. 10032–10038.
  14. Nilsson G. E., Renshaw G. M. C. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark // *J. Exp. Biol.* 2004. Vol. 207. P. 3131–3139.
  15. Rebelo M. F., Pfeiffer W. C., da Silva H. et al. Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) // *Aquat. Toxicol.* 2003. Vol. 64. N 3. P. 359–362.
  16. Roesijadi G. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals // *Environ. Health Perspect.* 1994. Vol. 102. N 12. P. 91–96.
  17. Vergani L., Grattarola M., Grasselli E. et al. Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. Vol. 465. N 1. P. 247–253.
  18. Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms // *Comp. Biochem. Physiol.* 2007. Vol. 146C. P. 281–300.
  19. Virtanen V., Bordin G., Rodriguez A.-R. Separation of Metallothionein Isoforms and Identification of Complexed Metals by Capillary Zone Electrophoresis Using Dopde Array Detection. *Trace Elem. Man Anim.* 10. Springer US, 2000. P. 1103–1105.

Стаття: надійшла до редакції 03.03.11

прийнята до друку 12.04.11

**SPECTRAL INDICES OF METALLOTHIONEINS OF CRUCIAN CARP *CARRASSIUS AURATUS* AS POTENTIAL BIOMARKER OF ENVIRONMENTAL POLLUTION**

**H. Falfushynska<sup>1</sup>, L. Gnatyshyna<sup>1</sup>, O. Turta<sup>1</sup>, O. Osadchuk<sup>1</sup>, M. Kasyanchuk<sup>2</sup>, O. Stoliar<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*V. Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University  
Research Laboratory of Comparative Biochemistry and Molecular Biology  
2, M. Kryvonis St., Ternopil 46027, Ukraine*  
<sup>2</sup>*Ternopil National Economical University  
11, Lvivska St., Ternopil 46004, Ukraine*

The spectral properties and metal content in metallothioneins (MTs) isoforms from the liver and gills of crucian carp *Carassius auratus* resided in clean (Z) and polluted (B) ponds after exposure of copper and manganese ions, as well as organochlorine and dithiocarbamate pesticides (each at two concentrations) during 14 days were compared. Differences between these characteristics of animals from two populations and their changes under exposure to disturbance factors, especially significant in group B due to decreased of metal-binding ability of MTs, especially in the gills were shown. By means of Canonical analysis the general features of UV spectra in fish under effect of natural complex pollution and the model action of pesticides were confirmed.

*Key words:* metallothioneins, crucian carp, spectral properties, heavy metals, pesticides.

**СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ КАРАСЯ *CARRASSIUS AURATUS* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ**

**Г. Фальфушинская<sup>1</sup>, Л. Гнатишина<sup>1</sup>, О. Турта<sup>1</sup>, О. Осадчук<sup>1</sup>,  
М. Касянчук<sup>2</sup>, О. Столяр<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Тернопольский национальный педагогический университет  
имени Владимира Гнатюка  
НИЛ сравнительной биохимии и молекулярной биологии  
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь 46027, Украина*  
<sup>2</sup>*Тернопольский национальный экономический университет  
ул. Львовская, 11, Тернополь 46004, Украина*

Сравнивали спектральные характеристики и содержание металлов в изоформах металлотиионенинов (МТ) печени и жабр карася *Carassius auratus* из чистого (З) и загрязненного (Б) водоемов при действии на организм ионов меди и марганца, а также хлорорганического и дитиокарбаматного пестицидов (каждого в двух концентрациях) на протяжении 14 суток. Установлены отличия этих характеристик между представителями двух популяций и их изменения при действии на организм исследуемых факторов, особенно существенные в группе Б, связанные с уменьшением металлсвязывающей способности МТ, особенно в жабрах. С помощью канонического анализа подтверждены общие признаки УФ-спектров у рыб, которые подвергаются природному комплексному загрязнению и модельному действию пестицидов.

*Ключевые слова:* металлотиионенины, карась, спектральные свойства, тяжелые металлы, пестициды.