

УДК [632.954+597.551.2]:577.122

ВЛАСТИВОСТІ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ЖАБИ *RANA RIDIBUNDA* З ДВОХ ПОПУЛЯЦІЙ ЗА ВПЛИВУ ФУНГІЦИДУ ТАТТУ

Л. Романчук

Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна
e-mail: stolyarok@rambler.ru

Порівнювали металотіонеїни (МТ) печінки жаб *Rana ridibunda* із умовно чистої та забрудненої місцевостей за їх участю в акумуляції міді, цинку і кадмію у тканині, а також за властивостями хроматографічних форм при дії на організм дитіокарбаматного фунгіциду ТАТТУ (10 мкг/л) протягом 14 діб. Встановлено відмінності у профілі елюції МТ жаб із двох популяцій, вищий вміст кадмію і менший вміст міді в МТ контрольних тварин із забрудненої місцевості та МТ обох груп жаб, на яких діяли ТАТТУ, порівняно з контрольними тваринами із чистої місцевості. Вміст міді в печінці жаб із двох місцевостей істотно відрізняється і зростає за дії ТАТТУ в обох популяціях. Вміст цинку в печінці жаб із двох місцевостей однаковий, але за дії ТАТТУ в чистій місцевості зменшується, а в забрудненій зростає. Вміст МТ у тканині однаковий у всіх групах тварин, а їх відносна акумулююча здатність під впливом ТАТТУ зростає у жаб із забрудненої місцевості.

Ключові слова: жаба, металотіонеїни, мідь, цинк, кадмій, ТАТТУ, дитіокарбамат.

Металотіонеїни (МТ) – це низькомолекулярні внутрішньоклітинні білки, які майже на 30% складаються із залишків цистеїну і знайдені у більшості живих організмів. Найбільш ймовірно, їх біологічною функцією є депонування іонів цинку у хребетних тварин і міді – у багатьох безхребетних та одноклітинних [20, 24]. Проте відкриття МТ і перспектива їх використання в біомоніторингу пов'язані з іншою їх функцією – унікальною здатністю зв'язувати іони кадмію та з надекспресією за підвищеного його вмісту в середовищі [20, 21, 24]. Крім того, за останній час з'явилась інформація про чутливість їх експресії до дії прооксидантних чинників, зокрема пестицидів [3, 18]. Тому питання стосовно використання МТ як біомаркерів забруднення середовища потребує більш детального дослідження.

Амфібії вважаються перспективними індикаторними видами для дослідження акумуляції забруднювачів [25]. Вони володіють високою проникністю шкіри для води і, оскільки перебувають у воді протягом тривалого часу, можуть відображати рівень забруднення водного середовища. Разом з тим, у природних популяціях МТ амфібій практично не досліджені [6]. Проведене нами вивчення акумуляції важких металів у печінці жаби дало змогу чітко розрізнити стан тварин із двох популяцій (у сільській та урбанізованій місцевостях) [22]. За результатами цього експерименту можна твердити, що тварини із популяції в урбанізованій місцевості зазнають хронічного впливу забруднення важкими металами, яке посилюється у літній період. Зокрема, в їх печінці акумулюється кадмій, хоча його вміст у воді перебуває на межі детекції. Тому логічно припустити, що функціональний стан МТ жаб із двох популяцій також відрізняється,

що можна виявити за дії на організм пошкоджуючого чинника. Для перевірки цього припущення ми дослідили вплив металомісного фунгіциду ТАТТУ, який, за літературними даними, володіє прооксидантними властивостями [1], на МТ жаб із умовно чистої та забрудненої території.

Дослідження проводили у липні 2007 р. на дорослих особинах жаби ставкової (*Rana ridibunda* L.). Для відбору екземплярів було обрано дві місцевості на р. Серет: у верхній течії біля села Івачів Тернопільської обл. (49°38' пн.ш., 25°31' сх.д.) та біля автомагістралі (с. Петриків) на витoku р. Серет із м. Тернополя (49°33' пн.ш., 25°37' сх.д.). Перша зона була прийнята за умовно чисту (Ч). Вона лежить у лісовій місцевості. Вище по течії і в регіоні загалом немає промислових об'єктів, автомагістралей інтенсивного аграрного виробництва. Друга зона позначена як умовно забруднена (З). Вона відповідає максимальному зосередженню муніципальних і промислових стоків м. Тернопіль, оскільки лежить на витoku з міста поблизу ринку, автозаправної станції, очисних споруд та на узбіччі автомагістралі з інтенсивним потоком транзитного автотранспорту, що сполучає південний, північний і західний напрямки руху через Тернопіль.

Самців жаби *Rana ridibunda* переносили в лабораторію, де витримували протягом 14 діб в акваріумах місткістю 40 л по шість тварин у кожному без освітлення. Відстояну водопровідну воду змінювали кожні дві доби. Тварин годували комерційним кормом для черепах, видаляючи залишки їжі при поновленні води. З кожної місцевості одна група тварин була контрольною (ЧК і ЗК), а іншій у воду додавали фунгіцид ТАТТУ в концентрації 9,1 мкг/л (групи ЧТ і ЗТ відповідно).

Фунгіцид ТАТТУ є поширеним препаратом, діючими речовинами якого є дитіокарбамати пропамокарб-гідрохлорид (248 г/л) і манкоцеб (302 г/л). При підборі концентрації ми керувалися рекомендаціями по використанню цього препарату і літературними даними. Зокрема, для манкоцебу виявлено, що тривала інкубація пуголовків, які, як відомо, є найбільш вразливою стадією розвитку жаби, призводить до гострої токсичності, а його концентрації вище 10 мкг/л викликають у них деформації та пригнічення росту [9]. Значення 96-год LC50 для манкоцебу у зеленої жаби становить 0,96–2,21 мг/л [7].

Тварин умертвляли під ефірним наркозом. Для дослідження брали печінку. Всі процедури з відбору й обробки тканин проводили на холоді. Всі реактиви, крім нижчезазначених, були фірми "Реахим" кваліфікації "хч".

Для виділення МТ використовували 10%-ний гомогенат 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 фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, "Sigma") [5]. Гомогенат центрифугували протягом 45 хв при 10000×g. Отриманий наосад інкубували 5 хв при 85°C, витримували 30 хв при 0°C для кращої преципітації та знову центрифугували в тих самих умовах. Екстракт піддавали іонообмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl (0–1 М) в тому ж буфері, який містив 0,001 М 2-ізопропанолу. Розмір колонки 1,5×50 см, об'єм проб – 5 мл, швидкість елюції – 0,5 мл/хв. Оптичну густину елюату реєстрували при 254 і 280 нм. Хроматографію проводили у двох повторах. МТ ідентифікували за особливостями світлопоглинання (високим співвідношенням світлопоглинання при 254 і 280 нм) і відповідністю до профілю елюції стандартного МТ печінки кролика (Sigma). Елюат кожної фракції МТ (15 мл) об'єднували та визначали в ньому вміст металів. Вміст МТ обчислювали

згідно з модифікованим рівнянням Гамільтона, за сумарним вмістом цинку і міді в МТ-1 і МТ-2, враховуючи стехіометричний характер зв'язування цих металів: $m(\text{MT})=0,5(v(\text{Zn}) \cdot M(\text{MT})/7+v(\text{Cu}) \cdot M(\text{MT})/12)$ (мкг), де v – кількість металу в МТ, мкмоль/г тканини; $M(\text{MT})$ молярна маса МТ, рівна 6800 г/моль, 7 і 12 – кількість іонів цинку і міді (I) відповідно, що зв'язуються молекулою МТ за повного насичення [17].

Вміст металів (цинку, міді та кадмію) у тканині печінки і фракціях МТ вимірювали після озолення зразків у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса : об'єм). Вміст цинку та міді визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115, кадмію – на спектрофотометрі S-600 і виражали в мкг на г вологої маси тканини. Для оцінки метал-депонуєчої потужності МТ ми обчислили співвідношення реального вмісту металу у тканині до теоретично максимальної металозв'язуючої потужності МТ за формулою:

Метал тканини: $\text{Метал МТ} = \text{Zn тканини}/(\text{MT} \times 7) + \text{Cd тканини}/(\text{MT} \times 7) + \text{Cu тканини}/(\text{MT} \times 12)$, де метал тканини – вміст металу в тканині (мкмоль/г тканини), МТ – вміст МТ в тканині (мкмоль/г тканини) [11].

Результати вимірів у гомогенатах тканини подані у вигляді $M \pm m$ для шести тварин, хроматографічних фракцій – $M \pm m$ для трьох вимірів. Імовірність відхилення двох рядів значень обчислювали з використання t -тесту Стьюдента. Імовірною вважали відмінність між рядами за $P < 0,05$. Математичний аналіз біохімічних показників здійснювали, використовуючи комп'ютерні програми Statistical Analysis System (SPSS), Statistica v6.0 та Excel для Windows-2000.

При іонообмінній хроматографії термостабільного екстракту тканин жаби (рис. 1) були одержані дві хроматографічні форми МТ з домінуванням МТ-1, що є типовим для хребетних тварин [12, 14]. Фракції були ідентифіковані згідно з об'ємом виходу маркерного МТ як МТ-1 (об'єм елюції 0,24 М NaCl) і МТ-2 або 2а (об'єм елюції 0,32 М NaCl або 0,36 М NaCl відповідно). У жаб із чистої місцевості спостерігалася більш рання елюція другої фракції порівняно з тваринами із забрудненої місцевості та з еталоном МТ кролика. Дія на жаб із обох популяцій фунгіциду не позначилася на профілі елюції їх МТ.

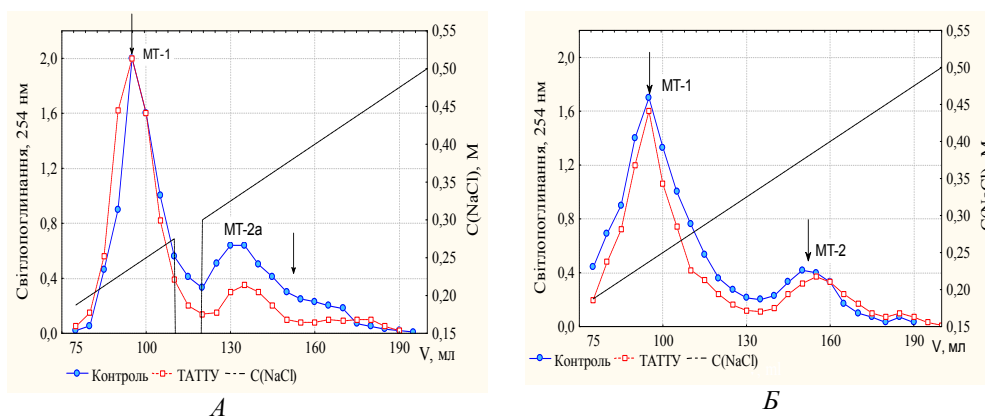


Рис. 1. Профілі елюції металотіонеїнів печінки жаби із умовно чистої (А) та забрудненої (Б) місцевостей, одержані при іонообмінній хроматографії термостабільного екстракту на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl (0–1 М) в 0,01 М трис-НСl буфері, рН 8,0. Стрілками позначено вихід фракцій МТ-1 і МТ-2 стандартного металотіонеїну печінки кролика.

УФ-спектри одержаних фракцій (рис. 2) мають типовий для МТ максимум поглинання в середньому ультрафіолеті (близько 254 нм), за винятком МТ-1 жаб із чистої зони, спектр якого у контрольній групі відображає певну гетерогенність фракції. Порівняння спектрів МТ різних груп тварин свідчить, що за дії ТАТТУ і/або в умовно забрудненій зоні спостерігається посилення поглинання у ближньому ультрафіолеті порівняно із відповідними спектрами МТ контрольних тварин із чистої місцевості.

Одержані фракції МТ містили цинк, мідь і кадмій, співвідношення кількості яких і розподіл між фракціями не мали принципових відмінностей у всіх досліджуваних групах, крім контрольної із чистої місцевості (рис. 3), у якій вміст міді в МТ був удвічі вищим, ніж в інших групах, а співвідношення кількості металів $Cu:Zn$ в МТ становило 1:2,4, тоді як в інших – 1:5. Вміст кадмію був вищим приблизно на 30% у групах із забрудненої місцевості, ніж у відповідних групах із чистої місцевості. Таким чином, були встановлені відмінності за характеристиками МТ контрольної групи жаб із чистої місцевості та трьох інших груп.

Визначення загального вмісту металів у тканині та його порівняння із вмістом в МТ (рис. 4) показує, що ці характеристики істотно відрізняються у групах тварин. По-перше, в контрольній групі тварин із забрудненої місцевості вміст міді у тканині удвічі нижчий, ніж із чистої місцевості. Для цинку такі відмінності не спостерігаються. Відмінності між вмістом міді в двох місцевостях були однотипними зі зменшенням частки міді в МТ від загального вмісту у тканині, але в забрудненій місцевості вони виражені більш помітно: загальний вміст міді у тканині за дії ТАТТУ зростав тут утричі. За вмістом цинку відмінності між контрольною групою і такою, що зазнала дії ТАТТУ, у двох місцевостях були протилежними. У жаб із чистої місцевості загальний вміст цинку в тканині за дії ТАТТУ зменшувався, а його частка в МТ зростала з 11,4 до 19,8% від загального вмісту в тканині. У забрудненій місцевості вміст цинку в тканині

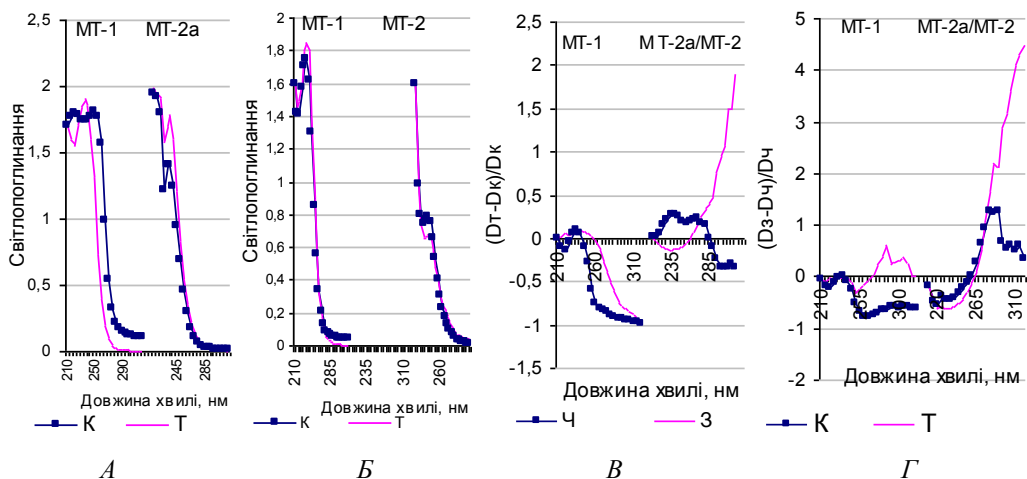


Рис. 2. Ультрафіолетові спектри металотіонейнів печінки жаби: *A* – умовно чиста місцевість; *B* – забруднена місцевість; *B* – відмінності між спектрами металотіонейнів жаб, що зазнавали впливу ТАТТУ, і контрольними тваринами з умовно чистої (Ч) та забрудненої (З) місцевостей; *Г* – відмінності між спектрами металотіонейнів жаб, що зазнавали впливу ТАТТУ (Т), та контрольними тваринами (К) у кожній місцевості.

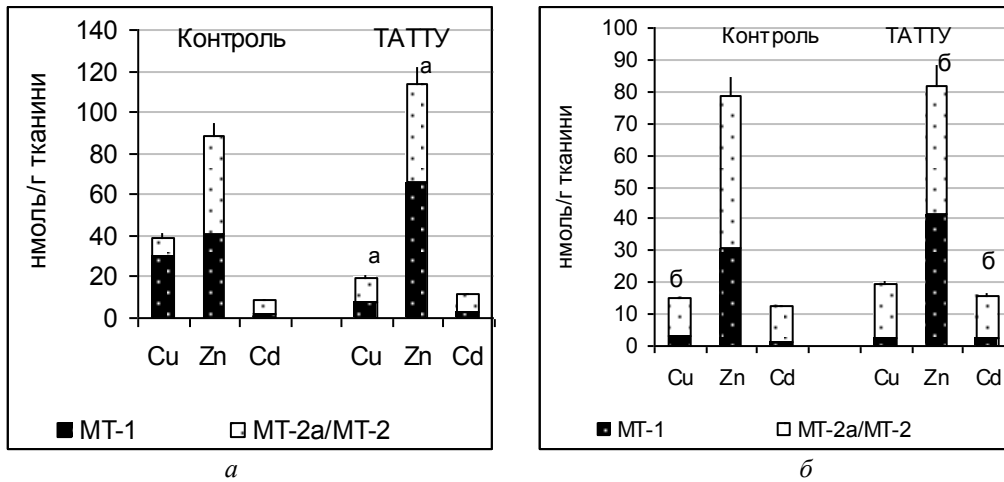


Рис. 3. Вміст міді, цинку і кадмію в металотіонеїнах у печінці жаби із умовно чистої та забрудненої місцевостей, нмоль·г⁻¹ тканини: *a* – відмінності між двома групами із однієї місцевості, *б* – відмінності між аналогічними групами із різних місцевостей імовірно, $P < 0,05$.

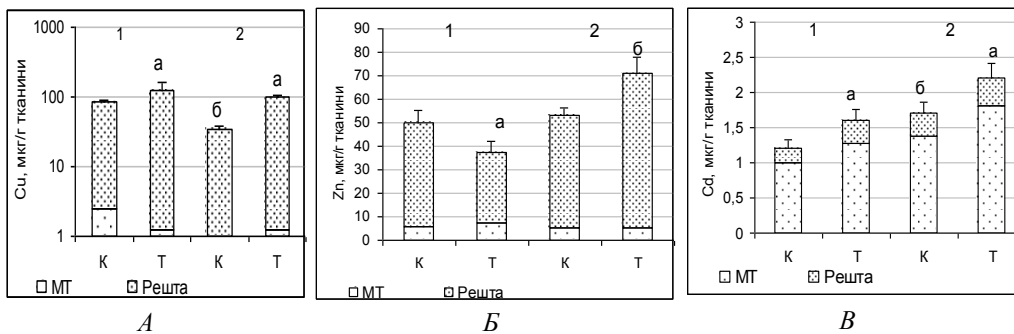


Рис. 4. Розподіл міді (А), цинку (Б) і кадмію (В) між металотіонеїнами та іншими компонентами у печінці жаби із умовно чистої (1) та забрудненої (2) місцевостей, мкг·г⁻¹ тканини: *a* – відмінності між двома групами із однієї місцевості, *б* – відмінності між аналогічними групами із різних місцевостей імовірно, $P < 0,05$. Група тварин, що зазнавала впливу ТАТТУ (Т), та контрольна група (К) у кожній місцевості.

істотно зростає при незмінному вмісті в МТ. Кадмій у печінці жаб був знайдений переважно у складі МТ, і відмінності між групами за загальним його вмістом в тканині відповідали таким у складі МТ.

Вміст МТ у печінці жаб із різних груп не відрізнявся і становив у групах ЧК і ЧТ $58,1 \pm 5,2$ мкг/г тканини і $66,4 \pm 5,7$ мкг/г тканини, а в групах ЗК і ЗТ $48,4 \pm 4,2$ мкг/г тканини і $53,0 \pm 4,9$ мкг/г тканини відповідно. Резервні можливості МТ в обох контрольних групах та ЧТ групі були використані на 23,5–26,6%, а в групі ЗТ – на 38,3% від акумуляційних можливостей цих білків.

Обраний нами для дослідження препарат контактних фунгіцидів, які належать до похідних етилен біс дитіокарбаматів, широко використовується для боротьби із фітофторозом томатів і картоплі, захисту зернових і олійних культур, у фруктових садах. Вони швидко розкладаються і не акумулюються у рослинах. Однак це не є достатньою підставою, аби говорити про їх безпеку, – вважають, що за більшість токсичних ефектів на біоту

відповідають продукти їх розпаду: етилентіосечовина (відома як канцероген і тератоген) та дисульфід карбону [1]. Відомо, що манкоцеб викликає зміни у співвідношенні статей амфібій [10] і нейротоксичність [2, 13]. Він посилює генерацію пероксиду водню в клітинах, причому цей ефект викликає як органічна частина молекули, так і іони марганцю, але не цинку у його складі [1]. Амфібії є порівняно вразливими до дії препаратів манкоцебу видами, тоді як для ссавців і олігохет у рекомендованих для вживання концентраціях він малотоксичний [9, 26]. Тому було логічним припустити, що цей пестицид виявить вплив на металодепонуючий і антиоксидантний білок МТ у печінці жаб.

МТ амфібій досліджені переважно за кількісною характеристикою і за дії високих концентрацій токсикантів у лабораторних умовах [6, 16, 23, 27]. Хроматографічну поведінку МТ у зв'язку з біоіндикацією вивчають переважно у безхребетних, тоді як нижчим хребетним присвячені лише окремі публікації [12, 14]. Встановлено, що число ізоформ МТ відрізняється серед тварин, які належать не лише до різних класів, але і до різних видів у тій самій родині [23]. Як видно з нашого дослідження, навіть у жаб із двох популяцій характеристики МТ-2(2а) були різними, причому ця відмінність не залежала від впливу ТАТТУ.

Ефективність МТ в акумуляції кадмію посилювалась у тварин за несприятливих умов існування – як залежно від місцевості, так і, особливо, від впливу ТАТТУ. Вищий вміст кадмію в печінці жаб із урбанізованої місцевості підтверджують і наші попередні результати [22]. Збільшення вмісту кадмію в МТ під впливом ТАТТУ в чистій місцевості може бути ознакою послаблення детоксикаційної здатності печінки, що проявляється як заміна есенціальних металів на токсичні за несприятливих умов [8]. Інформативним показником виявилась оцінка резервних можливостей МТ. Їх зменшення під впливом ТАТТУ у жаб із урбанізованої місцевості, хоча і далеко від межового значення, але є ознакою певних адаптаційних змін у гомеостазі металів.

Збільшення вмісту МТ у жаб спостерігається за дії високих сублетальних концентрацій іонів важких металів [16, 27], а в умовах екологічно реального рівня забруднювачів їх властивості не досліджені. У інших гідробіонтів встановлено кореляцію між вмістом кадмію та МТ у тканині, вмістом МТ і активністю ферментів антиоксидантного захисту [3, 18]. Застосована нами екологічно реальна концентрація ТАТТУ не привела до істотних змін вмісту і/або властивостей МТ. Лише посилення поглинання у ближньому ультрафіолеті в їх спектрах може свідчити про часткове окиснення тіолів [5]. Проте не можна стверджувати, що застосований фунгіцид у обраній концентрації був недіючим, оскільки його вплив привів до істотних і специфічних змін в акумуляції есенціальних металів. Як показує порівняння, у жаб, які зазнали впливу фунгіциду, значно вищий вміст недепонованої в МТ міді. Взагалі слід відзначити, що жаби володіють унікальною властивістю акумулювати в печінці велику кількість міді у незв'язаній з МТ формі. Якщо у риб, раків, молюсків мідь у печінці (травній залозі) на 20–40% зв'язана з МТ, то у жаб ці білки зв'язують лише 1–3% міді. За абсолютним вмістом міді в печінці й ефективністю її акумуляції із води жаби також у кілька разів перевершують названі організми [22]. Механізми детоксикації або потреби у такому високому вмісті цього редоксактивного металу в тканині невідомі. З результатів експерименту очевидно, що надлишок міді в печінці обох груп жаб за дії ТАТТУ може позначитися на функціональному стані тканини.

Найбільш помітною відмінністю між жабами із двох популяцій, що зазнали впливу фунгіциду, є протилежні зміни вмісту цинку в тканині, які і в цьому випадку не по-

в'язані із депонуючою функцією МТ. Відомо, що жаби досить чутливо реагують на підвищення вмісту цинку в середовищі. Так, тривала дія 4 мкг/л іонів цинку на жаб *Bufo arenarum* привела до зменшення вмісту цинку, активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та збільшення вмісту глутатіону в яєчниках без змін у печінці, що автори пояснюють можливою ефективністю МТ у печінці щодо цинку [15]. Проте, як видно з наших даних, надлишок цинку не індукує МТ у печінці жаб, тобто версія Naab та ін. [15] щодо детоксикаційної здатності МТ печінки у жаби видається неспроможною. З іншого боку, досить високі концентрації іонів металів виявляються сумісними із життям у жаб, причому вони викликають збільшення вмісту МТ у печінці [16, 27]. Тому механізми гомеостазу і детоксикації надлишку іонів металів у жаб, як і пошук адекватних маркерів для екологічно реальних концентрацій карбаматних фунгіцидів, потребують подальшого дослідження.

Відмінності в адаптаційній здатності тварин із різних популяцій малодосліджені [4, 19]. Наприклад, у моллюсків за більшістю показників антиоксидантного захисту за винятком глутатіону не спостерігалися відмінності між представниками двох популяцій моллюсків за дії міді [19]. Очевидно, функціональна активність МТ у жаб також є досить стабільною, на що вказує і необхідність застосування високих концентрацій важких металів для виявлення її змін [16, 27]. Разом з тим, підсумовуючи результати експерименту, можна стверджувати, що фунгіцид ТАТТУ в екологічно реальній концентрації істотно впливає на вміст міді та цинку і детоксикаційну функцію МТ щодо кадмію у печінці жаби, причому за характером змін вмісту цинку в тканині виявляються різні адаптивні можливості жаб із двох популяцій.

Робота виконувалася за підтримки МОН України в межах Спільного Українсько-Грецького науково-технічного проекту № М-65/2006 "Оцінка забруднення водного середовища існування важкими металами в Греції та Україні за допомогою біоіндикації з використанням жаби *Rana ridibunda* і риби *Cyprinus carpio*" та була частково підтримана Західно-Українським Біомедичним Дослідницьким центром.

1. Бардов В. Г., Омельчук С. Т., Седокур Л. К. и др. Токсикологическая характеристика и гигиеническое нормирование металаксила-М в продуктах питания и объектах окружающей среды // Современные проблемы токсикологии. 2000. № 3. С. 25–30.
2. Bisson M., Hontela A. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro* // Toxicol. Applied Pharmacol. 2002. Vol. 180. P. 110–117.
3. Cavaletto M., Ghezzi A., Burlando B. et al. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* // Comp. Biochem. Physiol. 2002. Vol. 131C. P. 447–455.
4. Chowdhury M. J., Grosell M., McDonald D. G., Wood C. M. Plasma clearance of cadmium and zinc in non-acclimated and metal-acclimated trout // Aquat. Toxicol. 2003. Vol. 64. P. 259–275.
5. Coyle P., Hubert C. A., Philcox J. C., Rofe A. M. Importance of storage conditions for the stability of zinc- and cadmium-induced metallothionein // Biol. Trace Elem. Res. 2001. Vol. 81. P. 269–278.
6. Dobrovoljc K., Falnoga I., Bulog B. et al. Hepatic metallothioneins in two neotenic salamanders, *Proteus anguinus* and *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata) // Comp. Biochem. Physiol. 2003. Vol. 135C. P. 285–294.

7. Ferrigan J. E. Effects of chronic fungicide and herbicide exposure on survival and development of amphibian larvae // A Thesis in Wildlife/Fisheries Biology. 2001. (Електронний ресурс <http://archive.lib.msu.edu/TIC/thesdiss/ferrigan2001a.pdf>).
8. Hayes T. B., Collins A., Lee M. et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 5476–5480.
9. Hanson P. J. Response of hepatic trace element concentrations in fish exposed to elemental and organic contaminants // Estuaries. 1997. Vol. 20. P. 659–676.
10. Harris M. L., Chora L., Bishop C. A., Bogart J. P. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens* and *Bufo americanus* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2000. Vol. 64. P. 263–270.
11. Hollis L., Hogstrand C., Wood C. M. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001. Vol. 41. N 4. P. 468–474.
12. Lacorn M., Lahrssen A., Rotzoll N. et al. Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implications for biomonitoring // Environ. Toxicol. Chem. 2001. Vol. 20. P. 140–145.
13. Domico L. M., Zeevalk G. D., Bernard L. P., Cooper K. R. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction // Neuro Toxicol. 2006. Vol. 27. P. 816–825.
14. Muto N., Ren H. W., Hwang G. S. et al. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius Cuvieri*) by air-pumping stress, dexamethasone, and metals // Comp. Biochem. Physiol. 1999. Vol. 122C. P. 75–82.
15. Naab F., Volcomirsky M., Burlon A. et al. Metabolic alterations without metal accumulation in the ovary of adult *Bufo arenarum* females, observed after long-term exposure to Zn⁽²⁺⁾, followed by toxicity to embryos // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001. Vol. 41. N 2. P. 201–207.
16. Papadimitriou E. A., Loumbourdis N. S. Copper kinetics and hepatic metallothionein levels in the frog *Rana ridibunda*, after exposure to CuCl₂ // BioMetals. 2003. Vol. 16. P. 271–277.
17. Paris-Palacios S., Biagianti-Risbourg S., Fouley A., Vernet G. Metallothioneins in liver of *Rutilus rutilus* exposed to Cu²⁺. Analysis by metal summation, SH determination and spectrofluorimetry // Comp. Biochem. Physiol. 2000. Vol. 126C. P. 113–122.
18. Paris-Palacios S., Biagianti-Risbourg S., Vernet G. Metallothionein induction related to hepatic structural perturbations and antioxidative defences in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to the fungicide procymidone // Biomarkers. 2003. Vol. 8. P. 128–141.
19. Regoli F., Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // Aquat. Toxicol. 1995. Vol. 31. P. 143–164.
20. Roesijadi G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation // Comp. Biochem. Physiol. 1996. Vol. 113C. P. 117–123.
21. Rotchell J. M., Clarke K. R., Newton L. C., Bird D. J. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel // Mar. Environ. Res. 2001. Vol. 52. P. 151–171.

22. Stolyar O. B., Loumbourdis N. S., Falfushinska H. I., Romanchuk L. D. Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2008. Vol. 54. P. 107–113.
23. Suzuki K. T. Quantification and characterization of metallothioneins in tissues of lower vertebrates and invertebrates // Experientia Suppl. 1987. Vol. 52. P. 265–272.
24. Valls M., Bofill R., González-Duarte R. et al. A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 32835–32843.
25. Venturino A., Rosenbaum E., Caballero de Castro A. et al. Biomarkers of effect in toads and frogs // Biomarkers. 2003. Vol. 8. P. 167–186.
26. Vermeulen L. A., Reinecke A. J., Reinecke S. A. Evaluation of the fungicide manganese-zinc ethylene bis(dithiocarbamate) (mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (Oligochaeta) // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2001. Vol. 48. P. 183–189.
27. Vogiatzis A., Loumbourdis N. S. Cd accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂ // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1998. Vol. 34. P. 64–68.

THE PROPERTIES OF METALLOTHIONEINS OF FROG *RANA RIDIBUNDA* FROM TWO POPULATIONS UNDER THE EFFECT OF FUNGICIDE TATTU

L. Romanchuk

*Ternopil Hnatiuk National Tacher-training University
2, Kryvonosa St., Ternopil 46027, Ukraine
e-mail: stolyarok@rambler.ru*

The metallothioneins (MT) from the liver of frog *Rana ridibunda* from the relative clean and polluted vicinities were compared by their participation in the copper, zinc and cadmium binding in the tissue and chromatographic forms properties under the effect of dithiocarbamate fungicide TATTU (10 µg/l) during 14 days. The differences in the MT elution profile of frogs from two populations, the higher cadmium and lesser copper levels in the MT of control animals from the polluted site and in the MT of both groups of frogs under the effect of TATTU in comparison with control animals from the clean vicinity. The copper level in the liver of frog from two vicinities is significantly different and is increased under the effect of TATTU in both populations. The level of zinc in the liver of frog from two vicinities is the same, but TATTU provokes its decreasing in the clean vicinity and increasing in the polluted one. The MT content is the same in all groups of animals, however the relative binding capacity of MT is elevated by the effect of TATTU in frogs from polluted vicinities.

Key words: frog, metallothioneins, copper, zinc, cadmium, TATTU, dithiocarbamate.

Стаття надійшла до редколегії 25.03.08
Прийнята до друку 30.03.08