



УДК 577.352.38:577.64

МЕТАЛОТІОНЕЇНИ ТА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО УРАЖЕННЯ В ТКАНИНАХ КОРОПА *CYPRINUS CARPIO* ЯК БІОМАРКЕРИ ЗАБРУДНЕННЯ СЕРЕДОВИЩА

Г. І. Фальфушинська¹, І. В. Гоч², Л. І. Бугера¹, О. Б. Столяр¹

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка,
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна.

²Головне державне управління охорони, використання і відтворення водних живих
ресурсів та регулювання рибальства у Тернопільській області
e-mail: oksana.stolyar@gmail.com

Порівнювали вміст металотіонеїнів (МТ), визначений за двома методами (за вмістом цинку і міді та за насиченням кадмієм), карбонільних похідних білків і супероксид аніону у печінці та зябрах коропа *Cyprinus carpio* з двох водойм (умовно чистої (А) та розташованої в індустріальній місцевості (І)) у три сезони. Часова залежність показників добре виражена в А групі та слабо в І групі згідно з факторним аналізом. У коропа І групи спостерігались вищий вміст МТ, карбонільних похідних білків і супероксид аніону та зменшена біодоступність фізіологічних металів марганцю і, особливо, заліза.

Ключові слова: короп, металотіонеїни, оксидативне ураження, важкі метали.

Металотіонеїни (МТ) є визнаним біомаркером забруднення середовища важкими металами, що серед нижчих хребетних найбільш переконливо продемонстровано для риб [14, 15, 23]. Проте питання специфічності відповіді МТ на дію певного чинника та меж реактивності залишаються далекими від вирішення [2, 6, 15]. Зокрема, МТ виявились ефективними знешкоджувачами активних форм кисню в системі *in vitro*, а їхня експресія активується прооксидантними чинниками [2, 15, 23], що робить актуальним вивчення взаємозв'язку між їхньою функцією та ефективністю антиоксидантного захисту в організмі. Як відомо, оксидативний стрес характеризує неспецифічну відповідь організму на несприятливі чинники різної природи, у переліку яких не лише прооксиданти, але й хімічно неактивні органічні сполуки та метали постійної валентності [13, 15]. Вивчення МТ у гідробіонтів басейну р. Дністер є особливо цікавим з точки зору оцінки їхньої специфічності як маркерів забруднення, адже для цих водойм властиве забруднення не важкими металами, а фенолами та іншими органічними речовинами внаслідок відсутності водоочисних споруд, стихійного використання агрохімікатів тощо [5, 11, 20, 21].

Коропові риби є поширеним дослідним організмом при вивченні впливу токсичних чинників у модельних умовах, однак аналізові їхніх біохімічних показників у природних умовах існування приділено мало уваги, а в Україні такі роботи практично невідомі [1, 6, 17]. Тому метою нашого дослідження стало зіставлення функціонального стану МТ і показників окисної деструкції тканин коропа за екологічно реальних умов існування. Оскільки редокс-активні метали є важливими чинниками антиоксидантно-прооксидантної рівноваги у біологічних тканинах, ми визначали також біодоступність заліза та марганцю для коропа.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводились у травні, липні та вересні на дорослих особинах коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) масою 250–350 г і розміром 20–25 см. Було обрано дві місцевості для відбору екземплярів: рибогосподарський став у верхів'ях р. Серет, де не ведеться промислова діяльність і немає інтенсивних потоків автотранспорту (А група), та став с. Острів у середній течії р. Серет, нижче обласного центра та місця скиду вод із його очисних споруд, у районі відносно високої індустріальної активності й інтенсивних транспортних потоків (І група). Екземпляри тварин відбирали траловим методом, доставляли в лабораторію у воді з природної водойми, яку піддавали аерації, та досліджували протягом не більше ніж 12 год після відбору. Експерименти проводились у відповідності з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). Шість тварин у кожній групі умертвляли під ефірним наркозом. Для дослідження брали передню долю печінки і зябра. Усі процедури з відбору й обробки тканин проводили на холоді. Усі реактиви, крім нижчезазначених, були фірми „Реахим” кваліфікації „хч”.

Вміст МТ визначали за двома методами – за вмістом цинку і міді у формах МТ [16], одержаних за допомогою іонообмінної хроматографії термостабільного екстракту тканини на ДЕАЕ-целюлозі, та за насиченням кадмієм у загальному термостабільному екстракті [24]. Одержання екстракту та хроматографічне виділення МТ проводили, як описано [6], використовуючи 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 [4] та інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, „Sigma”). Вміст МТ обчислювали згідно з модифікованим рівнянням Гамільтона, враховуючи стехіометричний характер зв'язування цих металів:

$$m(\text{MT})=0,5(v(\text{Zn}) \cdot M(\text{MT})/7 + v(\text{Cu}) \cdot M(\text{MT})/12) \text{ (мкг)},$$

де: v – загальна кількість металу у формах МТ, мкмоль/г тканини; $M(\text{MT})$ молярна маса МТ, прийнята за 6800 г/моль, 7 і 12 – кількість іонів цинку та міді (І) відповідно, що зв'язуються молекулою МТ за повного насичення [16].

Для визначення вмісту МТ за насиченням кадмієм термостабільний екстракт інкубували з розчином CdCl_2 , після чого незв'язаний кадмій видаляли взаємодією з розчином бичачого гемоглобіну („Sigma”). Вміст МТ обчислювали за стехіометрією зв'язування кадмію (7 іонів на молекулу МТ) [24].

Вміст металів (заліза, марганцю, цинку, міді та кадмію) вимірювали після озолення зразків у перегнаній нітратній кислоті на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115 (заліза, марганцю, цинку і міді) або спектрофотометрі S-600 (кадмію). Проби води попередньо упарювали в 50 разів, тканину висушували протягом 24 год при температурі 105°C.

Для дослідження показників оксидативного стресу виготовляли 10%-ний (маса/об'єм) гомогенат тканини в 50 мМ К-фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Визначення карбонільних похідних білків проводили після осадження білків хлорною кислотою з 0,5 мл гомогенату за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [3]. Утворення супероксид аніону визначали у розчинній фазі гомогенату за ступенем відновлення цитохрому с [9].

Результати вимірів подані у вигляді $M \pm m$ для 6 тварин, або для 3 повторних вимірів (аналіз води та хроматографічний аналіз МТ, одержаних з об'єднаного гомогенату 5 тварин дослідної групи). Імовірність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням t -тесту Стьюдента. Ймовірно вважали відмінність між рядами за $P < 0,05$. Обчислювали Біоаккумуляційний фактор (БАФ) металів як співвідношення концентрації у тканині (мг/кг тканини) і у воді (мкг/л води). Використовували Факторний (центроїдний груповий) аналіз суми характеристик кожної досліджуваної тварини для встановлення її відповідності певній групі. Математичний аналіз показників здійснювали з використанням пакету дисперсійного аналізу ANOVA та кореляційного тесту Пірсона, використовуючи комп'ютерні програми Statistical Analysis System (SPSS), Statistica v6.0 та Exel для Windows-2000.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

При іонообмінній хроматографії термостабільного екстракту тканин коропа (рис. 1) було одержано дві форми МТ, ідентифіковані як МТ-1 і МТ-2 згідно з профілем елюції маркера та літературних даних [6, 10]. Загальний вміст міді і цинку в цих формах був використаний для обчислення вмісту МТ у тканинах. В обох місцевостях

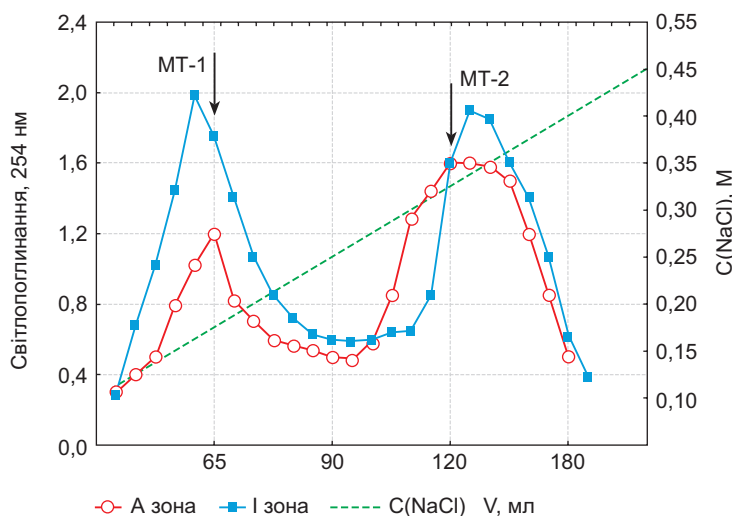


Рис. 1. Профілі елюції металотіонеїнів печінки та зябер коропа, одержані при іонообмінній хроматографії термостабільного екстракту на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl (0–1 М) в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 8,0. Стрілками позначено вихід фракцій МТ-1 і МТ-2 стандартного металотіонеїну печінки кролика

Fig. 1. Ion exchange chromatography elution profiles of thermostable extract from carp liver and gills on DEAE-cellulose are shown by the solid lines, a gradient of elution buffer – by the dotted line. Arrows indicate the elution volume of standard metallothionein from rabbit liver

і тканинах найнижчий вміст МТ відзначається в літній період (табл. 1). Спостерігаються і відмінності вмісту МТ між групами тварин – у І групі він помітно вищий, ніж в А групі, особливо восени (у чотири рази). Обидва застосовані для обчислення вмісту МТ, методи демонструють подібні динаміку та відмінності між групами, що для вмісту МТ в печінці підтверджується кореляційним аналізом ($r=0,74$, $P=0,000$).

Таблиця 1. Вміст металотіонеїнів у печінці та зябрах коропа з умовно чистої (А) та індустріальної (І) місцевостей, мкг·г⁻¹ тканини, визначений за трьома методами (M±m)
Table 1. Metallothioneins content in carp liver and gills, μg·g⁻¹ of tissue, determined by three methods (M±m)

Дослідні групи		За вмістом міді та цинку	За насиченням кадмієм	За вмістом тіолів (за даними [6])
Печінка				
Весна	A	120,3±9,4	123,4±18,1	34,5±7,8
	I	171,6±11,2 ^b	153,2±16,9 ^b	84,2±22,8 ^b
Літо	A	27,1±2,2 ^a	36,9±3,2 ^a	62,4±14,9 ^a
	I	42,5±3,8 ^{a,b}	38,7±8,6 ^a	38,1±4,6 ^{a,b}
Осінь	A	78,6±7,7 ^a	154,1±21,7	85,5±16,1 ^a
	I	121,4±9,7 ^{a,b}	694,6±53,9 ^{a,b}	439,3±20,3 ^{a,b}
Зябра				
Весна	A	109,4±8,7	62,5±18,0	7,2±2,9
	I	135,9±9,4	73,9±7,9	33,8±10,8 ^b
Літо	A	25,2±1,8 ^a	27,2±4,5 ^a	33,4±3,9 ^a
	I	33,0±2,9 ^a	22,6±3,0 ^a	18,2±1,2 ^{a,b}
Осінь	A	44,1±3,6 ^a	131,2±7,4 ^a	30,3±3,1 ^a
	I	71,8±6,7 ^{a,b}	250,7±16,0 ^{a,b}	66,7±25,3 ^b

Примітка. Тут і далі: ^a – часові зміни порівняно з весною, ^b – відмінності між місцями вилову, $P < 0,05$.

Як видно з рис. 2, вміст карбонільних похідних білків у печінці в обох групах коропа найнижчий у літній час. Для решти характеристик окисного ураження в А групі влітку відзначені найбільші прояви, а в І групі відмінності між періодами спостереження не виражені. Порівняння двох груп показує, що в тканинах коропа І групи навесні та восени величини обох показників вищі, ніж в А групі, а в літній період у них відзначено менший вміст карбонільних похідних білка.

Вміст металів у воді (табл. 2) найменший у літній період. В індустріальній місцевості він здебільшого вищий, ніж в умовно чистій. Вмістові металів у тканинах коропа притаманна спільна динаміка зі збільшенням від весни до літа–осені ($r>0,53$, $P<0,05$) за винятком вмісту марганцю в зябрах. Порівняння двох груп показує, що вміст марганцю у тканинах досить постійний, а вміст заліза здебільшого вищий в А групі. Згідно з обчисленням БАФ, у риб І групи зменшена біодоступність марганцю влітку, а заліза – у всі терміни за одним винятком (влітку у зябрах) порівняно з А групою (табл. 3).

Згідно з дисперсійним аналізом ANOVA, вплив часу і місцевості на всі показники, за винятком впливу місцевості на вміст марганцю в печінці ($P=0,11$), достовірний, причому місцевість відбору впливає на часові закономірності у всіх випадках ($P<0,05$). За допомогою кореляційного тесту Пірсона було доведено взаємозв'язок між вмістом МТ і показниками окисної деструкції в обох тканинах навесні та восени (за винятком супероксид аніону восени) ($r>0,60$, $P<0,002$). Факторний аналіз, який

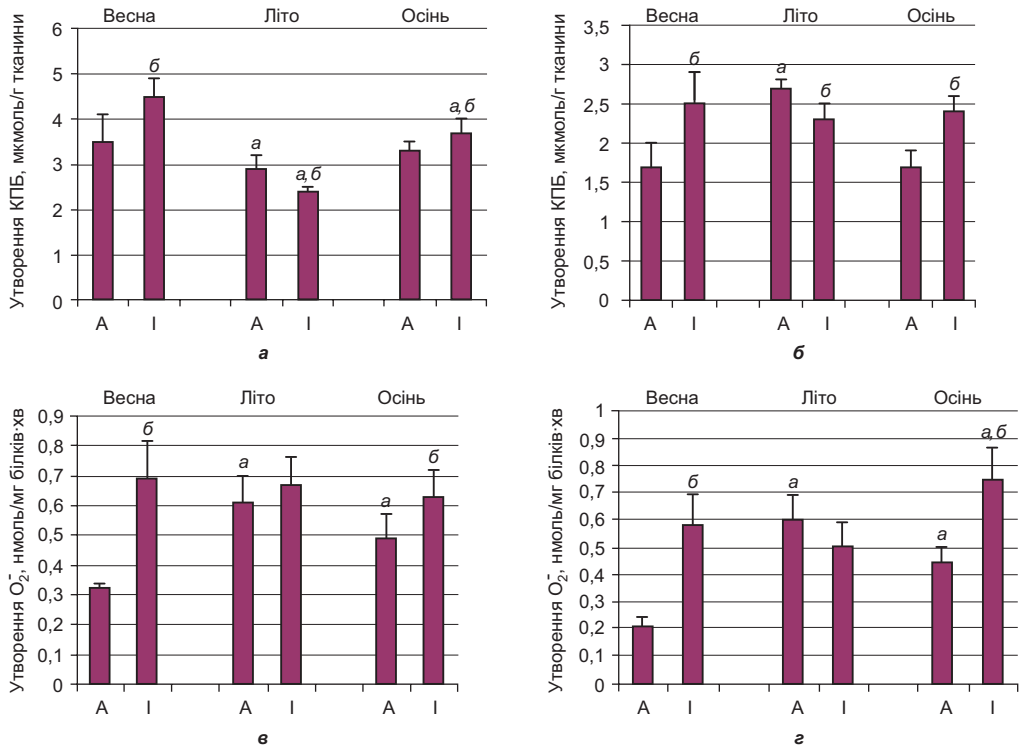


Рис. 2. Біомаркери оксидативного стресу в печінці (а, в) і зябрах (б, г) коропа з умовно чистої (А) та індустріальної (І) місцевостей:

карбонільні похідні білків, КПБ (а, б), утворення супероксид аніону (в, г), $M \pm m$, $n=6$: а – часові зміни порівняно з весною, б – відмінності між місцями вилову. $P < 0,05$

Fig. 2. Biomarkers of oxidative stress in the liver (а, в) and gills (б, г) of carp from relatively clean (А) and situated in the industrial site (І) two vicinities:

protein carbonyls (а, б), superoxide anion (в, г), $M \pm m$, $n=6$: а – between seasons statistically significant differences compared to spring values; б – between sites statistically significant differences. $P < 0.05$

включає всі досліджувані характеристики та вміст МТ, визначений за вмістом тіолів [6] (рис. 3), показав, що 61,6% даних у печінці та 70,7% даних у зябрах описуються двома першими факторами, що є високим показником їхньої системності. При цьому всі тварини А групи чітко диференціюються за часом визначення, тоді як для І групи така диференціація виражена гірше.

Відомо, що для визначення вмісту МТ у водних тварин використовуються альтернативні методи, результати яких при паралельному виконанні не завжди збігаються [14, 16, 23, 25]. Зокрема, два методи, що ґрунтуються на оцінці вмісту тіолів, полярографічний і спектрофотометричний (за взаємодією із дитіонітробензойною кислотою), при оцінці вмісту МТ у печінці риби султанки *Mullus barbatus* дають значення в діапазоні 20–900 мкг/г тканини [12, 18, 25]. Більше того, якщо визначення цими методами вмісту МТ у лабораторних умовах на тих самих групах тварин дає подібні результати, то при порівнянні тварин із природних водойм – відмінні [25].

Зіставлення результатів, одержаних у нашому експерименті та за вмістом тіолів [6], показує, що вони відповідають діапазонаві показників для риб [18] і в цілому

Таблиця 2. Вміст марганцю і заліза у тканинах коропа (мкг·г⁻¹·сухої маси; $M \pm m$, $n=6$) та воді (мкг·л⁻¹; $M \pm m$, $n=3$)

Table 2. Manganese and iron content in carp tissues ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight, $M \pm m$; $n=6$), and in the water ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $M \pm m$; $n=3$)

Метал	Місцевість	Весна	Літо	Осінь
Печінка				
Марганець	A	4,4±0,4	9,9±2,0 ^a	6,2±1,0 ^a
	I	6,6±0,8 ^b	8,3±0,5 ^a	7,4±1,2
Залізо	A	624,7±127,9	1463,5±369,0 ^a	1612,7±330,2 ^a
	I	370,1±83,0 ^b	692,9±115,8 ^{a,b}	1117,9±209,8 ^{a,b}
Зябра				
Марганець	A	10,5±1,9	7,6±0,8 ^a	7,4±0,4 ^a
	I	8,6±1,0	8,2±1,2	6,2±0,6 ^{a,b}
Залізо	A	303,3±27,6	501,4±87,5 ^a	1263,1±200,7 ^a
	I	268,1±47,9	1098,9±216,8 ^{a,b}	1021,1±113,5 ^a
Вода				
Марганець	A	49,3±2,7	2,7±0,2 ^a	20,9±1,7 ^a
	I	63,8±3,6 ^b	4,3±0,3 ^{a,b}	23,2±1,7 ^a
Залізо	A	275,9±18,9	73,8±5,2 ^a	308,1±14,3
	I	330,1±17,8	111,4±9,8 ^{a,b}	835,0±29,2 ^{a,b}

Таблиця 3. Біоаккумуляційні фактори марганцю і заліза у тканинах коропа (мг·кг⁻¹·сухої маси/мкг·л⁻¹·води, $M \times 10^3 \pm m$)

Table 3. Bioaccumulative factors of manganese and iron in carp tissues ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ·dry weight/ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ·water, $M \times 10^3 \pm m$)

Метал	Місцевість	Весна	Літо	Осінь
Печінка				
Марганець	A	0,1±0,0	3,7±0,7 ^a	0,3±0,0 ^a
	I	0,1±0,0	1,9±0,1 ^{a,b}	0,3±0,0 ^a
Залізо	A	2,3±0,5	19,8±5,4 ^a	5,2±1,1 ^a
	I	1,2±0,3 ^b	6,2±1,0 ^{a,b}	1,3±0,3 ^b
Зябра				
Марганець	A	0,2±0,0	2,9±0,3 ^a	0,4±0,0 ^a
	I	0,1±0,0 ^b	1,9±0,3 ^{a,b}	0,3±0,0 ^{a,b}
Залізо	A	1,1±0,1	6,8±1,2 ^a	4,1±0,7 ^a
	I	0,8±0,1 ^b	9,9±1,9 ^{a,b}	1,2±0,1 ^{a,b}

узгоджено відображають часові та просторові відмінності. Певна різниця абсолютних величин може пояснюватися ймовірними втратами білка при хроматографії, високою окиснювальною здатністю тіолів, яка, до того ж, залежить від природи хелатованого металу і навіть за умов захисту тіолів від окиснення у процесі виділення білків усе ж може спотворювати результати [4]. Крім того, реальне насичення МТ фізіологічними металами може бути нижчим від їхньої максимальної потужності, виявленої за взаємодією з кадмієм. Проте це не вносить принципових змін у порівняльні результати спостережень.

Отже, метод насичення кадмієм, апробований при визначенні МТ амфібій [24], може бути використаний і для риб як досить простий і коректний. З іншого боку,

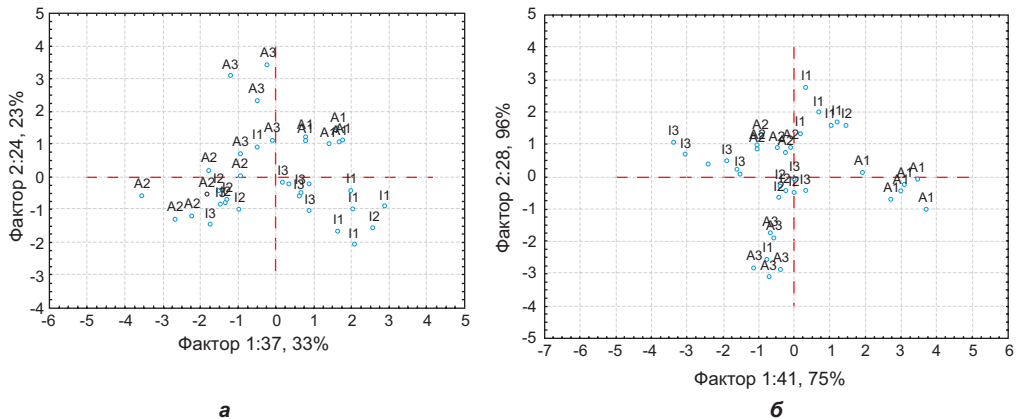


Рис. 3. Факторний (груповий центроїдний) аналіз групової належності особин коропа за набором даних (вміст металотіонеїнів за вмістом міді та цинку, насиченням кадмію та тіолами [6]), супероксид аніону, карбонілів білків, марганцю і заліза) печінки (а) та зябер (б): А1, А2, А3 та І1, І2, І3 – групи з умовно чистої та індустріальної місцевостей навесні, влітку і восени відповідно

Fig. 3. Centroid grouping analysis of the data set from the each specimen indices (metallothioneins level determined by zinc and copper content, by cadmium saturation and thiol measuring method [6]), protein carbonyls, superoxide anion, manganese and iron) in the liver (a) and gills (b) of carp from relatively clean (A) and situated in the industrial site (I) water bodies in spring (A1 and I1), summer (A2 and I2), and autumn (A3 and I3)

хроматографічний аналіз МТ, який використовується для характеристики селективності зв'язування металів і молекулярної маси експресованих форм МТ, забезпечує адекватну інформацію і при оцінці загального вмісту МТ у тканині.

За нашими попередніми даними [5, 6, 21] та результатами визначення вмісту марганцю і заліза у воді, в індустріальній місцевості спостерігається комплексне забруднення, яке негативно позначається на різноманітних показниках життєвого статусу водних тварин (оксидативний стрес, нейротоксичність, гормональні розлади). Підвищений вміст продуктів окисної модифікації білків у тканинах коропа та неспроможність супероксиддисмутази ефективно видаляти надлишок супероксид аніону в тканинах, відзначені нами у цій роботі, узгоджуються з цими спостереженнями. За результатами факторного аналізу видно, що в І групі порушені фізіологічні залежності показників від часу (місяця) визначення, які притаманні тваринам А групи, що може пояснюватися тривалим впливом несприятливих чинників.

Щодо здатності марганцю та заліза як відомих Фентон-металів ініціювати оксидативний стрес [13], наші результати, очевидно, не можна назвати парадоксальними, оскільки зменшення біодоступності металів у І групі може бути і виявом неспроможності ефективно зв'язувати ці йони у біологічні структури, тобто причиною зростання кількості вільних йонів, які, власне, і посилюють генерацію активних форм кисню.

У нашому дослідженні доведено, що активація функції (збільшення вмісту) МТ відбувається здебільшого одночасно зі зростанням вмісту супероксид аніону й окисних модифікацій білків у тканинах коропа, що узгоджується з літературними даними про наявність чутливих до оксидативного стресу елементів у генах МТ [2, 15, 17]. Таким чином, одержані результати дають підстави стверджувати, що експресія МТ коропа активується за оксидативного ураження тканин, що особливо виражено восени.

Влітку низький порівняно з іншими сезонами вміст МТ у тканинах не є достатньою підставою для висновку про поліпшення екологічної ситуації, адже саме в цей час рівень супероксид аніону, а у зябрах і карбонільних похідних білків, досягає в більшості груп найвищих значень. Можна припустити, що влітку, особливо в І місцевості, спостерігаються ознаки перевищення потужності детоксикаційних систем, убіквітин-залежного протеолізу окиснених білків [22] тощо. Саме влітку, згідно з факторним аналізом, тварини обох груп найбільш подібні між собою за комплексом показників, що свідчить про переважний ефект теплового чинника (а, відповідно, і кисневого режиму у водоймах) над ефектом локального забруднення.

Таким чином, одержані нами дані свідчать про активацію метал-депонуючої функції МТ в індустріальній місцевості на тлі зменшення біодоступності фізіологічних металів і оксидативного ураження у коропа. Сезонна залежність істотно модулюється цим впливом. Методи кадмій-сатурації та визначення фізіологічних металів у фракції МТ можуть бути рекомендовані як взаємозамінні залежно від завдань експерименту.

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*”.

1. Арсан О.М. Состояние и перспективы развития водной экотоксикологии. **Гідробіологічний журнал**, 2007; 43(6): 50–64.
2. Барабой В.А., Петрина Л.Г. Металлотионеины: структура и механизмы действия. **Український біохімічний журнал**, 2003; 75 (4): 28–36.
3. Луцка В.І., Багнюкова Т.В., Луцка О.В. Показники оксидативного стресу. 1. Тіобарбітурактивні продукти і карбонільні групи білків. **Український біохімічний журнал**, 2004; 76 (3): 136–141.
4. Coyle P., Hubert C.A., Philcox J.C., Rofe A.M. Importance of storage conditions for the stability of zinc- and cadmium-induced metallothionein. **Biological Trace Element Research**, 2001; 81 (3): 269–278.
5. Falfushynska H.I., Stoliar O.B. Function of metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2009; 72 (5): 1425–1432.
6. Falfushynska H.I., Stoliar O.B. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2009; 72 (3): 729–736.
7. Hansen B.H., Romma S., Garmo O. A. et al. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2006; 143C (3): 263–274.
8. Hanson P.J. Response of hepatic trace element concentrations in fish exposed to elemental and organic contaminants. **Estuaries**, 1997; 20 (4): 659–676.
9. Hassoun E.A., Ray S. The induction of oxidative stress and cellular death by the drinking water disinfection by-products, dichloroacetate and trichloroacetate in J774.A1 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2003; 135C (2): 119–128.
10. Lacorn M., Lahrssen A., Rotzoll N. et al. Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implications for biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2001; 20 (1): 140–145.
11. Lebedynets M., Sprynskyy M., Kowalkowski T., Buszewski B. State of Environment in the Dniester River Basin (West Ukraine). **Environmental Science and Pollution Research**, 2004; 11 (4): 279–280.

12. Lionetto M.G., Giordano M.E., Caricato R. et al. Biomonitoring of heavy metal contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, 2001; 11 (4): 305–310.
13. Livingstone D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, 2001; 42 (8): 656–666.
14. Marjić V.F., Raspor B. Age- and tissue-dependent metallothionein and cytosolic metal distribution in a native Mediterranean fish, *Mullus barbatus*, from the Eastern Adriatic Sea. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2006; 143C (4): 382–387.
15. Monserrat J.M., Martínez P.E., Geracitano L.A. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2007; 146C (1–2): 221–234.
16. 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. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2000; 126C (2): 113–122.
17. 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; 8 (2): 128–141.
18. Regoli F., Pellegrini D., Winston G.W. et al. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, 2002; 44 (9): 912–922.
19. 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. **Marine Environmental Research**, 2001; 52 (2): 151–171.
20. Sapoznikova Y., Zubcov N., Hungerford S. et al. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. **Chemosphere**, 2005; 60 (2): 196–205.
21. 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. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2008; 54 (1): 107–113.
22. Velickovska V., Lloyd B.P., Qureshi S., van Breukelen F. Proteolysis is depressed during torpor in hibernators at the level of the 20S core protease. **Journal of Comparative Physiology**, 2005; 175B (5): 329–335.
23. Viarengo A., Lafaurie M., Gabrielides G.P. et al. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. **Marine Environmental Research**, 2000; 49 (1): 1–18.
24. Vogiatzis A., Loumbourdis N.S. Cd accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 1998; 34 (1): 64–68.
25. Zorita I., Stroglyoudi E., Buxens A. et al. Application of two SH-based methods for metallothionein determination in mussels and intercalibration of the spectrophotometric method: laboratory and field studies in the Mediterranean Sea. **Biomarkers**, 2005; 10 (5): 342–359.

METALLOTHIONEINS AND THE INDICES OF OXIDATIVE DAMAGE IN THE TISSUES OF CARP *CYPRINUS CARPIO* AS THE BIOMARKERS OF THE ENVIRONMENTAL POLLUTION

*H. I. Falfushinska*¹, *I. V Goch*², *L. I. Bugera*¹, *O. B. Stoliar*¹

¹*Ternopil National Pedagogical University
2, M. Kryvonis St., Ternopil 46027, Ukraine*

²*Main State Agency of the Safety, Utilization and Reproduction of Aquatic
Living Resources and Fishery Regulation in the Ternopil Region*

The content of metallothioneins (MT) determined by two methods (by zinc and copper content and by cadmium saturation), protein carbonyls and superoxide anion have been compared in the liver and gills of carp *Cyprinus carpio* from two water basins (relatively clean (A) and situated in the industrial site (I)) during three seasons. The temporal dependence is revealed in the A group and less in the I group according to the Factor analysis. The higher levels of MT, protein carbonyls and superoxide anion, as well as low bioavailability of essential metals manganese and, especially, iron were detected in carp from the industrial site.

Key words: carp, metallothioneins, oxidative damage, heavy metals.

МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И ПОКАЗАТЕЛИ ОКСИДАТИВНОГО ПОРАЖЕНИЯ В ТКАНЯХ КАРПА *CYPRINUS CARPIO* КАК БИОМАРКЕРЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ

*Г. И. Фальфушинская*¹, *И. В. Гоч*², *Л. И. Бугера*¹, *О. Б. Столяр*¹

¹*Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь 46027, Украина*

²*Главное государственное управление охраны, использования и воспроизведения
водных живых ресурсов и регулирования рыболовства в Тернопольской области*

Сравнивали содержание металлотионеинов (МТ), определенное двумя методами (по содержанию цинка и меди и по насыщению кадмием), супероксид аниона и карбонильных производных белков в печени и жабрах карпа *Cyprinus carpio* из двух водоемов (условно чистого (А) и расположенного в индустриальной местности (I)) в три сезона. Временная зависимость показателей хорошо выражена в А группе и слабо в I группе согласно факторного анализа. У карпа I группы наблюдались более высокое содержание МТ, супероксид аниона и карбонильных производных белков и меньшая биодоступность физиологических металлов марганца и, особенно, железа.

Ключевые слова: карп, металлотионеины, оксидативное поражение, тяжелые металлы.

Одержано: 29.07.2009