

УДК 581.192:546

МЕТАЛОТІОНЕЇНИ ПРІСНОВОДНИХ ТВАРИН ЯК БІОМАРКЕРИ ЗАБРУДНЕННЯ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА ЙОНАМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Г. Фальфушинська

Тернопільський державний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна
e-mail: halynkaF@ukr.net

Досліджено взаємодію апотіонеїну рака (*Astacus leptodactylus* L.) та жаби (*Rana esculenta* L.) з йонами важких металів за УФ-спектрами реконструйованих металотіонеїнів. Для Pb-МТ та Fe-МТ обох видів характерні смуги поглинання з максимумом, відповідно, при 240 та 235–250 нм. Спектри Cu-МТ, Zn-МТ та Cd-МТ рака і жаби мають видові особливості. За дії суміші йонів Cd^{2+} та Pb^{2+} на Т рака у визначенні спектральних властивостей домінують йони свинцю. Визначення складу металів у МТ за їхніми УФ-спектрами можна використати в біоіндикації забруднення водойм залізом та свинцем.

Ключові слова: металотіонеїн, апотіонеїн, мідь, цинк, залізо, кадмій, свинець, біомаркер.

З огляду на суттєву роль, яку відіграють важкі метали (ВМ) в забрудненні природних водойм, останніми роками значну увагу приділяють відшукуванню чутливих методів біоіндикації та оцінки їхньої токсичності для різних гідробіонтів [2]. Більшість праць присвячено вивченню впливу поллютантів на морфологічні показники, летальність, рефлекторно-поведінкові реакції організмів та ін [1]. Новим напрямом досліджень стало дослідження відповіді на дію забруднювачів на молекулярному рівні з визначенням вмісту металотіонеїнів (МТ) [7]. Металотіонеїни – це специфічні, багаті на цистеїн стресорні білки, які можуть зв'язувати надлишок ВМ в організмі та виконувати регуляторну функцію [8, 13, 14]. У біоіндикації забруднення водойм використовують визначення вмісту МТ у тканинах водних тварин [7]. Водночас МТ притаманні специфічні спектральні властивості [8, 10], визначені наявністю метал-тіолатних кластерів і відсутністю ароматичних залишків у їхньому складі [8, 10, 12-14]. Раніше ми з'ясували, що спектральні властивості реконструйованих МТ печінки коропа залежать від природи зв'язаного металу [5, 6]. Становило інтерес також дослідити, чи є ця модель відповіді універсальною для гомологічних МТ прісноводних тварин, рака та жаби зокрема, реконструйованих з апоформи за тих же умов.

Дослід проводили на дорослих особинах рака вузькопалого (*Astacus leptodactylus* L.) та жаби ставкової (*Rana esculenta* L.) живою масою 50 ± 5 та 12 ± 2 г, довжиною тіла 10 ± 1 та 5 ± 1 см, відповідно. Тварин витримували дві доби в умовах акваріуму і забивали шляхом декапітації.

Розчин термостабільних білків (ТБ) печінки одержували з 10% гомогенату підшлунково-печінкової залози рака та печінки жаби в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 8,0 шляхом центрифугування протягом 45 хв при 10 000 g, термообробки (5 хв при 85°C) і наступного центрифугування за тих самих умов. Гель-фільтрацію розчину ТБ виконували на сефа-

дексі G 75 тим же буфером. Металотіонеїни ідентифікували як фракцію ТБ з максимальним співвідношенням D_{254}/D_{280} [4]. Для одержання апотіонеїну (Т) МТ інкубували із 100 мМ розчином EDTA протягом 48 год при температурі 4°C [5]. Для реконструкції МТ в умовах *in vitro* 0,13 μM розчин білка інкубували протягом 2 год при $t = 18^\circ\text{C}$ з 0,91 μM розчином іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} або суміші Cd^{2+} і Pb^{2+} за умови, що 1 моль білка може зв'язати 7 молів металу [8,13] Після інкубування надлишок металу відокремлювали на колонці розміром 1,5x25 см, заповненій сефадексом G 25 та врівноваженій 0,01 М трис-НСІ, рН=8,0. Вміст білків визначали методом Лоурі та співавт.

Для кореляційного аналізу використовували диференційні спектри $((D_d - D_k)/D_k$, де D_d і D_k – оптичне поглинання дослідного та контрольного зразка, відповідно, за однакової довжини хвилі) [5]. Інтервал між вимірюваннями становив 5 нм. Кореляція вірогідна ($f = 21$, $p \leq 0,01$) при $r^3 0,54$.

Металотіонеїни підшлунково-печінкової залози рака та печінки жаби за поведінкою в разі розподільної хроматографії на сефадексі G 75 подібні до МТ коропа, досліджених нами раніше [5,6]. Згідно з цими даними, їхня молекулярна маса становить близько 7 кДа. Як і у коропа, показник співвідношення світлопоглинання D_{254}/D_{280} у МТ рака та жаби вірогідно вищий порівняно із важкою фракцією ТБ ($1,6 \pm 0,1$ проти $0,90 \pm 0,05$ та $2,47 \pm 0,10$ проти $1,49 \pm 0,05$, відповідно), що свідчить про низький вміст ароматичних амінокислот у їхньому складі. Однак порівняно із МТ коропа в спектрі МТ рака та жаби є відмінності у положенні максимуму в середньому УФ, що може бути зумовлено специфікою складу металів. Для МТ рака характерний зсув смуги від 250-255 до 260-270 нм (рис.1). В УФ-спектрах одержаних апоформ також простежено певні відмінності порівняно зі спектрами коропа: збільшення оптичної густини в ділянці 210–240 нм у спектрі Т жаби, та зменшення – в ділянці 240–280 нм у обох дослідних тварин (див. рис. 1).

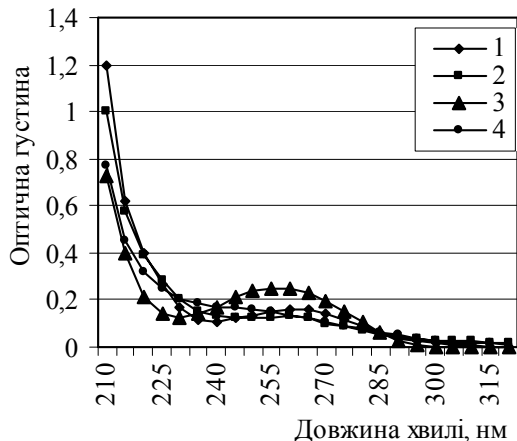


Рис. 1. УФ-спектри МТ рака (1), Т рака (2), МТ жаби (3), Т жаби (4).

рака простежено зсув смуги поглинання від 255–270 до 240 нм порівняно із нативним МТ та значне збільшення її інтенсивності (рис. 3). У випадку визначення спектральних властивостей МТ, реконструйованих із сумішшю іонів, що містять кадмій та свинець, УФ-спектр одержаного МТ подібний до гомометалічного Pb-МТ ($r=0,82$).

Унаслідок реконструкції МТ рака із йонами міді, цинку та кадмію одержували спектри, для яких характерні смуги поглинання з максимумом близько 260–265 нм (рис. 2). Диференційні спектри Cu-МТ, Zn-МТ та Cd-МТ рака корелювали між собою ($r(\text{Cu-МТ}/\text{Zn-МТ}) = 0,94$; $r(\text{Cu-МТ}/\text{Cd-МТ}) = 0,85$) та зі спектром нативного МТ ($r=0,96$; $r=0,93$ та $r=0,85$, відповідно). Це може свідчити про повну реконструкцію в умовах *in vitro* МТ рака з йонами металів, яким властиве зв'язування в метал-тіолатні кластери за фізіологічних умов [4, 14]. Для спектра Fe-МТ рака характерне збільшення інтенсивності оптичної густини реконструйованого МТ в ділянках 230–255 та 265–295 нм. У спектрі Pb-МТ

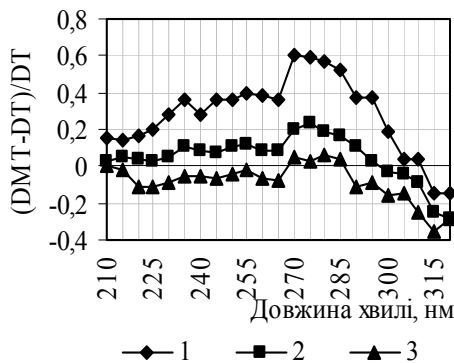


Рис.2. Диференційні спектри реконструйованих МТ жаби: 1 – Cu-МТ, 2 – Zn-МТ, 3 – Cd-МТ

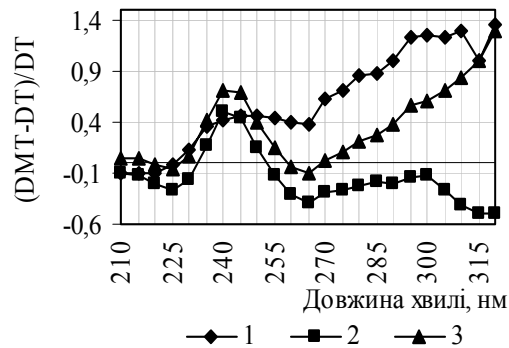


Рис.3. Диференційні спектри реконструйованих МТ жаби: 1 – Fe-МТ, 2 – Pb-МТ, 3 – Pb/Cd-МТ.

В УФ-спектрі, одержаному за дії йонів міді на Т жаби, виявлено збільшення оптичної густини в ділянці 245–320, проте реконструйований МТ не подібний до нативного. В разі інкубації Т жаби із Zn^{2+} та Fe^{2+} одержано МТ із подібними спектрами ($r=0,87$). В них зафіксовано всі ознаки наявності тіолатних кластерів: смуга поглинання з максимумом 250–255 нм та збільшення оптичної густини при 220 нм для Zn-МТ, характерне для Zn-МТ [13] (рис. 4). У спектрі, одержаному після взаємодії Т жаби із йонами Cd^{2+} , ознаки метал-тіолатних кластерів не були виражені, незважаючи на те, що Cd^{2+} за умов забруднення найефективніше зв'язується з МТ різних видів тварин [8]. У спектрі Pb-МТ жаби зареєстровано зсув смуги поглинання від 250–255 до 240 нм порівняно із нативним МТ (рис. 5).

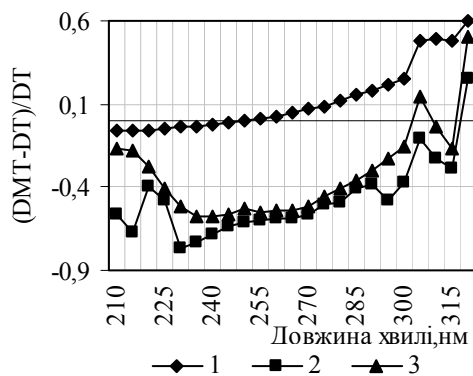


Рис.4. Диференційні спектри реконструйованих МТ жаби: 1 – Cu-МТ, 2 – Zn-МТ, 3 – Cd-МТ. Для кривої 1 масштаб 1:5.

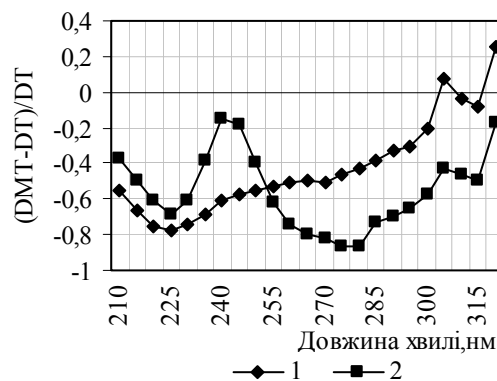


Рис.5. Диференційні спектри реконструйованих МТ жаби: 1 – Fe-МТ, 2 – Pb-МТ.

Кореляційний аналіз спектрів реконструйованих МТ рака, жаби й одержаних раніше спектрів МТ коропа [5, 6] засвідчив (див. таблицю), що дія Pb^{2+} , Fe^{2+} і суміші Pb^{2+} з Cd^{2+} приводить у всіх трьох видів до утворення подібних спектрів. За дії Cu^{2+} виявляється подібність спектрів у МТ рака і коропа, тоді як спектр МТ жаби має суттєві відмінності. За дії цинку спектри МТ усіх трьох видів не корелюють між собою.

Коефіцієнти кореляції між диференційними спектрами реконструйованих МТ рака та жаби з МТ коропа [5, 6] за однакового складу металів

Реконструйовані МТ	Рак	Жаба
Cu-МТ	0,61*	-0,8
Zn-МТ	0,42	-0,57
Cd-МТ	0,76*	-0,51
Fe-МТ	0,89*	0,95*
Pb-МТ	0,80*	0,85*
Cd/Pb-МТ	0,90*	–

* Кореляція вірогідна

Отже, виявлено універсальний характер відповіді МТ різних організмів за умов *in vitro* на метали, які неспецифічні для цих білків, – залізо та свинець. Водночас на метали, для яких характерне зв'язування у тіолоатні кластери за умов *in vivo*, відповідь МТ організмів, що перебувають на різному еволюційному рівні розвитку, специфічна. Відомо, що здатність МТ зв'язувати мідь та цинк змінюється в онтогенезі [10, 12]. Варіабельність відповіді МТ різних видів на ці метали може залежати також від α -, β -кластерної організації структури МТ. Відомо, що для ракоподібних характерна саме β , β -кластерна структура МТ, яка і є мідьзв'язувальною [14]. Це узгоджується з особливостями спектра МТ рака.

За П.М.Лінніком, концентрація міді, цинку та свинцю у природних водоймах дорівнює, відповідно, 10-120, 40-160 та 6,2-64 мкг/л [1]. Концентрації йонів металів, досліджених нами для Zn^{2+} , Cu^{2+} і Pb^{2+} , є в межах їхнього вмісту в забруднених водоймах. Тому можна розглядати МТ прісноводних тварин, незалежно від виду, як перспективні біомаркери забруднення водойм свинцем, залізом та сумішшю йонів, у якій є йони свинцю. А для біоіндикації Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+} необхідно враховувати видові особливості тварин. Кореляційний аналіз диференційних спектрів МТ є зручною формою порівняння особливостей зв'язування металів з цими білками.

1. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* Str. и других ветвистоусых ракообразных // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36. № 5. С. 50 – 70.
2. Брагинский Л.П., Линник П.Н. К методике токсикологического эксперимента с тяжелыми металлами на гидробионтах // Гидробиол. журн. 2003. Т. 39. № 1. С. 92–104.
3. Линник П.Н. Тяжелые металлы в поверхностных водах Украины: содержание и формы миграции // Гидробиол. журн. 1999. Т. 35. № 1. С. 22 – 41.
4. Столяр О.Б., Арсан В.О., Хоменчук В.О. Акумуляція свинцю низькомолекулярними термостабільними білками гепатопанкреасу коропа та їх властивості за інтоксикації свинцем (II) // Доп. НАН України. 2002. № 4. С. 192–196.
5. Фальфушинська Г.І., Столяр О.Б., Касянчук М.М. Металотіонеїни як біомаркери забруднення водного середовища йонами купруму та цинку // Наук. зап. ТДПУ. Сер. Біологія. 2003. №1. С.94-97.
6. Фальфушинська Г.І., Демків І.Я., Столяр О.Б., Флекей П.П. Аналіз металозв'язуючої здатності металотіонеїнів за їх УФ-спектрами // Мед. хімія. 2003. Т. 5. № 4. С. 39-41.

7. *Correia A.D.; Lima G.; Costa M.H.; Livingstone D.R.* Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea): I. Induction of metallothionein and lipid peroxidation // *Biomarkers*. 2002. Vol. 7. N 5. P. 422–437.
8. *Dallinger R., Wang Yu., Berger B.* et al. Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia* // *Eur. J. Biochem*. 2001. Vol. 268. N15. P. 4126–4133.
9. *Das K., Jacob V., Bounquegneau J.M.* White-sided delphin metallothioneins: purification, characterisation and potential role // *Comp. Biochem. And Physiol*. 2002. N. P. 245–251.
10. *Munger K., Germann U. A., Beltramini M.* et al. (Cu,Zn)-Metallothioneins from Fetal Bovine Liver // *J. Biol. Chem*. 1985. Vol. 260. N 18. P. 10032–10038.
11. *Oh K.-B., Watanabe T., Matsuoka H.* A novel copper-binding protein with characteristic of a metallothionein from a clinical isolate of *Candida albicans* // *Microbiol*. 1999. Vol. 145. N. P. 2423–2429.
12. *Riggio M., Filosa S., Parisi E., Scudiero R.* Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish) // *Comp. Biochem. and Physiol*. 2003. Vol. 135. N 2. P. 191–196.
13. *Toyama M., Yamashita M., Hirayama N., Murooka Y.* Interactions of Arsenic with Human Metallothionein-2 // *J. Biochem*. 2002. Vol. 132. N 2. P. 217–221.
14. *Valls M., Bofill R., Gonzales-Duarte R.* et al. A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution // *J. Biol. Chem*. 2001. Vol. 276. N 35. P. 32835 – 32843.

METALLOTHIONEINS OF FRESHWATER ANIMALS AS BIOMARKER OF WATER POLLUTION BY HEAVY METAL IONS

H. Falfushynska

*Ternopil State Pedagogical University by Volodymyr Hnatuck
Kryvonosa Str., 2, Ternopil 46027, Ukraine
e-mail: halynka@ukr.net*

Interaction between crawfish (*Astacus leptodactylus* L.) and toad (*Rana esculenta* L.) apothionein (T) and heavy metal ions by UV absorption spectra of reconstruction metallothionein (MT) were investigated. Shoulders at 240 nm and 235–250 nm correspondingly for Pb-MT and for Fe-MT of both species were characteristic. Crawfish and toad' Cu-MT, Zn-MT and Cd-MT had its own species features of UV-spectra. At action of Cd²⁺ and Pb²⁺ ions mixes on T, lead ions in determined of spectral characteristics were dominated. MT of freshwater animals as perspective biomarker of water contamination by lead and iron were used.

Key words: metallothionein, apothionein, copper, zinc, cadmium, lead, iron, biomarker.

Стаття надійшла до редколегії 31.10.2003
Прийнята до друку 15.01.2004