

УДК 574.522; 577.112; 574.632

МЕТАЛОТІОНЕЇНИ МОЛЮСКІВ ЯК БІОХІМІЧНІ ІНДИКАТОРИ ПОЛІМЕТАЛІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Лукашов Д.В.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
e-mail: dek@biocc.univ.kiev.ua

Надійшла до редакції 28.01.2010

Визначено вміст металотіонеїнів в травній залозі моллюсків *Lymnaea stagnalis* L. з 24 різних водойм України. З'ясовано, що концентрація металотіонеїнів коливалася у межах 0,07-1,90 мкг/г. Виявлено статистично значимий зв'язок між концентрацією Cd та Cu у тканинах моллюсків та вмістом металотіонеїнів. При концентрації Cd в межах 0,13-0,71 мг/кг вміст металотіонеїнів є стабільним і в середньому становить $0,18 \pm 0,03$ мкг/г. Підвищення концентрації Cd до 0,71-1,75 мг/кг викликає різке зростання вмісту металотіонеїнів до 0,95-1,90 мкг/г.

Ключові слова: металотіонеїни, важкі метали, забруднення, водні екосистеми.

ВСТУП

Металотіонеїни (МТ) – група термостабільних цитоплазматичних білків, які описані для різних систематичних груп організмів – дріжджів, тварин, водоростей та рослин. Вони характеризуються аномально високим вмістом сірки, близько 30% якої припадає на цистеїн, та повною відсутністю ароматичних амінокислот. Ці білки здатні зв'язувати *in vivo* та *in vitro* значну кількість $d10$ металів у двох доменних кластерах за допомогою тіолових зв'язків цистеїну. Ефективність зв'язку з цистеїновими групами збільшується в ряду металів $Zn < Cd < Cu < Ag < Hg$ [1]. Причому у тварин виявлено різні ізоформи, які відрізняються за своєю спорідненістю до різних металів [2].

Тривалий час основна функція МТ в клітині залишалася невідомою. Вважали, що МТ виконують антиоксидантну функцію, є стресовими білками (у відповідь на підвищену температуру, голодування, інфекцію), здійснюють депонування цистеїну [3]. Значний інтерес до дослідження МТ з'явився після відкриття явища стимуляції синтезу цих білків у відповідь на вплив токсичних доз широкого кола важких металів [4]. Встановлено, що рівень вмісту МТ є пропорційним концентрації деяких металів у навколишньому середовищі. Завдяки цьому рівень МТ висувають на роль неспецифічного маркера забруднення середовища важкими металами [1, 3].

Найбільш інтенсивне зростання концентрації МТ реєстрували за дії іонів Cd [5]. Проте, пізніше було виявлено подібний вплив підвищених концентрацій інших металів, особливо виражений для Cu, Zn та Hg [3]. Встановлено, що іони Cd викликають активацію синтезу МТ в клітині. Вважають, що основним

чинником індукції експресії генів, які кодують МТ, є підвищення концентрації вільних іонів Zn в клітині як результат їх витіснення з молекули МТ іншими важкими металами, зокрема Cd [1].

У природних умовах в МТ моллюсків домінують асоціації Zn та Cu [2]. Вплив підвищених концентрацій Cd призводить до заміщення у молекулі МТ атомів Zn та Cu на Cd. Проте, незважаючи на дію навіть сублетальних концентрацій Cd, в молекулах МТ безхребетних тварин (моллюсків, ракоподібних) завжди залишається зв'язаною деяка частка атомів Cu [1]. За дії іонів Hg та Ag відбувається повне заміщення інших атомів металу. Так іони Ag витісняють з молекули МТ атоми Cu, Zn, Cd з практичним виходом 96%, що використовують для кількісного визначення МТ [3].

Гідробіонти акумулюють в своїх тканинах надзвичайно високі концентрації важких металів. Причому рівні накопичення металів в їх організмі відображують не тільки концентрацію забруднювачів у довкіллі, а й їх біологічну доступність для живих організмів, яка лежить в основі токсичності. Моллюски характеризуються вираженою акумуляційною здатністю, яка перевищує показники, характерні для інших гідробіонтів. Рівні акумуляції важких металів в моллюсках можна використовувати для виявлення забруднення водних екосистем [6]. Проте, для отримання кількісної оцінки ступеню забруднення необхідно встановити чіткі критерії, які визначатимуть граничну величину концентрації металу, перевищення якої буде свідчити про наявність забруднення. Такому критерію відповідають фонові концентрації важких металів у гідробіонтах, розраховані на підставі аналізу хімічного складу тканин моллюсків з відносно незабруднених водойм [7].

Граничні фонові рівні вмісту важких металів повинні відповідати межі переходу організму від норми до стану патології. Перевищення вмісту важких металів в організмі буде свідчити про наявність забруднення середовища лише за умов прояву специфічних фізіологічних реакцій. Відомо, що зміни хімічного складу тканин молюсків можуть відображати процеси, безпосередньо не пов'язані з наявністю забруднення [8]. Тому, в якості фізіолого-біохімічного маркера забруднення середовища важкими металами в представлені роботі було обрано рівень вмісту МТ в організмі ставковика звичайного *Lymnaea stagnalis* L. Зазначений вид червононогих молюсків є традиційним об'єктом біологічного моніторингу прісноводних екосистем [5, 6, 16].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для дослідження було обрано 24 водойми з 13 областей України, які розташовані в різних фізико-географічних зонах. З кожної водойми відбирали по 10 особин *L.stagnalis* стандартного розміру: висотою черепашки $42,1 \pm 2,2$ мм, масою $3,8 \pm 1,1$ г. Живих молюсків доставляли до лабораторії протягом 2-х діб у вологих бавовняних мішечках, які зберігали при температурі $5-8^{\circ}\text{C}$. Для визначення вмісту важких металів використовували 6 екземплярів, м'які тканини яких відокремлювали від черепашки та зберігали при -15°C . У 4-х особин відокремлювали травну залозу (гепатопанкреас) та використовували для визначення вмісту МТ. З обраних водойм одночасно відбирали по 2 л води (у двох повторностях) та два зразки верхнього 5 см шару донних відкладів з місця мешкання молюсків.

Для визначення важких металів тканини молюсків висушували до постійної маси при 95°C та розчиняли у 56% перегнаній HNO_3 (хч) при додаванні кількох крапель 35% H_2O_2 (хч). Проби води концентрували шляхом випарювання 1 л до 10 мл з додаванням 1 мл HNO_3 (хч). Для визначення вмісту важких металів у донних відкладах використовували кислоторозчинну фракцію, яку екстрагували 5М розчином HNO_3 (хч).

Важкі метали визначали за допомогою полум'яного атомно-адсорбційного спектрофотометру С115-М1 з дейтерієвим коректором фону та комп'ютерно-аналітичним комплексом КАС-11.

Вміст МТ визначали методом заміщення сріблом за [9] у модифікації [10]. Метод ґрунтується на заміщенні атомів металів, хелатованих у молекулі МТ, на атоми Ag. Зразок тканини гепатопанкреасу молюска масою 400 мг гомогенізували у 0,4 мл тріс-НСІ буферу (0,1 М, рН 8,5). Гомогенат нагрівали на водяній бані протягом 3-х хвилин, охолоджували та центрифугували в атмосфері азоту при 50°C протягом 20 хв. при 8000 г. До 0,2 мл супернатанту додавали 0,2 мл розчину 20 мг/л Ag (у вигляді AgNO_3) у тріс-НСІ буфері та інкубували при 20°C протягом 10 хв. Після цього вносили 0,1 мл 2% розчину бичачого гемоглобіну для зв'язування надлишку іонів Ag, нагрівали на водяній бані протягом 3-х хвилин, охолоджували та

центрифугували 5 хв. при 4000 г для осадження денатурованого гемоглобіну. Розчин гемоглобіну вносили тричі. В кінці супернатант центрифугували протягом 30 хв. при 8000 г. До розчину додавали 0,5 мл 56% перегнаної HNO_3 (хч), вимірювали кінцевий об'єм та визначали концентрацію Ag за допомогою атомно-адсорбційного спектрофотометру. Вміст Ag у супернатанті відповідав кількості зв'язаного металу молекулами МТ. Для калібрування використовували розчин МТ з нирок коня (Sigma Chemical, USA). Концентрацію МТ виражали у мкг/г маси сирової тканини.

Середні показники концентрації виражали як середнє арифметичне з наведенням діапазону довірчого інтервалу ($\bar{X} \pm tS'_{\bar{X}}$). Для характеристики сили зв'язку між досліджуваними параметрами використовували коефіцієнт кореляції Пірсона (r_p). Мінливість показників виражали через коефіцієнт варіації (Cv) [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст МТ у травній залозі *L.stagnalis* коливався в межах від $0,07 \pm 0,01$ мкг/г (Дніпропетровська обл., Апостоловський р-н) до $1,90 \pm 0,08$ мкг/г (Івано-Франківська обл., Коломиївський р-н) (табл. 1). Молюски з п'яти водойм характеризувалися достовірно високим вмістом МТ, який знаходився в межах $0,95-1,90$ мкг/г. Три такі водойми були розташовані на заході України (Івано-Франківська та Тернопільська обл.), одна в Миколаївській обл., та одна – на Київщині. В інших 19-ти районах концентрація МТ в ставковиках була значно меншою ($p < 0,05$) і знаходилася у діапазоні $0,07-0,35$ мкг/г. Таким чином, відмінності між мінімальним та максимальним показником вмісту МТ становили понад 28 разів, а коефіцієнт варіації (Cv) досягав 126%. Причому найбільші внутрішньовибіркові коливання концентрації МТ були характерні для молюсків з найвищим вмістом даних білків.

Серед важких металів найбільші коливання вмісту у м'яких тканинах були характерні для Cd, концентрацію якого реєстрували в межах $0,13-1,75$ мг/кг, Cv – 126%. Найменша мінливість була властива для концентрації Zn, вміст якого знаходився у межах $51-89$ мг/кг, Cv – 13%. Значні розбіжності вмісту різних металів пов'язані зі здатністю молюсків регулювати обмін таких есенціальних металів як Zn та Cu. У той же час ці гідробіоти не можуть активно впливати на процеси накопичення/виведення неесенціальних елементів, таких як Cd [12]. Проте порівняння вмісту важких металів з хімічним складом їх середовища мешкання показало, що вміст Zn у тканинах молюсків залежав від концентрації цього металу у водному середовищі ($r_p = 0,65$, $p < 0,05$). Тобто, в такому випадку *L.stagnalis* поводить себе як безбар'єрний організм по відношенню до Zn. Концентрація інших металів в м'яких тканинах не залежала від хімічного складу води та донних відкладів.

Таблиця 1

Вміст металотіонеїнів та важких металів у тканинах *L. stagnalis* з різних водойм України
($\bar{X} \pm tS_{\bar{X}}$, n = 4-6)

№	Географічні координати		Область	Концентрація МТ мкг/г	Концентрація металів, мг/кг		
	N ⁰	E ⁰			Cd	Zn	Cu
1	49,7294	28,67448	Вінницька	0,11±0,01	0,13±0,01	69±12	7±2
2	47,73112	33,87932	Дніпропетровська	0,07±0,01	0,14±0,01	66±8	17±5
3	48,18721	34,47007	Дніпропетровська	0,12±0,01	0,26±0,02	78±19	15±3
4	48,35441	33,86517	Дніпропетровська	0,13±0,01	0,71±0,02	81±21	12±4
5	48,75369	33,98318	Дніпропетровська	0,22±0,03	0,50±0,01	77±18	11±2
6	48,92187	34,91597	Дніпропетровська	0,17±0,02	0,20±0,02	89±21	8±3
7	48,15055	23,03286	Закарпатська	0,24±0,05	0,58±0,02	81±28	45±15
8	48,67764	25,06404	Івано-Франківська	1,90±0,56	1,32±0,08	78±30	52±22
9	48,97735	23,98433	Івано-Франківська	1,60±0,23	1,75±0,12	71±14	40±12
10	50,26908	30,92493	Київська	1,52±0,02	0,87±0,02	68±13	13±3
11	47,82605	32,15762	Кіровоградська	0,22±0,03	0,53±0,01	73±5	17±4
12	47,91493	33,21199	Кіровоградська	0,12±0,01	0,47±0,01	65±22	21±6
13	48,33448	33,25915	Кіровоградська	0,25±0,01	0,44±0,02	68±18	12±3
14	48,77752	32,70738	Кіровоградська	0,17±0,01	0,21±0,01	64±14	10±1
15	49,49505	23,1253	Львівська	0,11±0,01	0,36±0,02	62±17	10±3
16	49,80989	23,18403	Львівська	0,35±0,02	0,69±0,03	78±25	21±2
17	47,7044	32,36983	Миколаївська	1,52±0,55	1,12±0,05	80±31	23±11
18	50,19291	25,39627	Рівненська	0,17±0,01	0,21±0,01	81±24	24±8
19	51,57819	33,42053	Сумська	0,21±0,01	0,26±0,01	64±19	16±3
20	49,45502	25,21202	Тернопільська	0,95±0,14	0,71±0,01	85±20	26±8
21	49,97166	26,40611	Хмельницька	0,27±0,01	0,33±0,01	56±12	15±5
22	49,03884	32,66387	Черкаська	0,18±0,01	0,22±0,02	72±19	10±3
23	49,80293	31,53182	Черкаська	0,16±0,01	0,36±0,02	64±24	7±1
24	51,16767	32,00815	Чернігівська	0,09±0,01	0,29±0,03	51±17	8±3
Коефіцієнт варіації (Cv), %				126	76	13	65

Порівняння вмісту МТ у травній залозі та рівнів накопичення важких металів у м'яких тканинах *L. stagnalis* виявило тісний зв'язок з концентрацією Cd, $r_p = 0,88$ (рис. 1). Слід враховувати, що травна залоза червононогих молюсків виступає основним депо Cd в організмі [13]. Тому вміст МТ у гепатопанкреасі є найвищим у порівнянні з іншими тканинами [2, 14]. Проте виявлена залежність між вмістом МТ та Cd не є лінійною. Кількість МТ в травній залозі практично не змінюється при підвищенні концентрації Cd в тілі молюсків до 0,71 мг/кг, після досягнення якої вміст МТ різко зростає. Також значною виявилася залежність між рівнем МТ та вмістом Cu у тканинах молюсків, $r_p = 0,62$ ($p < 0,05$). Проте, особини з високим вмістом зазначеного металу одночасно характеризувалися як підвищеним вмістом МТ, так і такими рівнями, які були характерні для ставковиків з низькою концентрацією Cu. Вміст Zn явного впливу на вміст МТ не здійснював. Оскільки зв'язок між концентрацією Cd та Cu у тканинах ставковиків та їх присутністю у навколишньому середовищі був відсутнім, хімічний склад води та донних відкладів впливу на рівні МТ в травній залозі молюсків не мав.

Більшість досліджень особливостей динаміки вмісту МТ в молюсках проведено у лабораторних умовах, часто за дії надзвичайно високих концентрацій

важких металів. Наприклад, індукцію синтезу МТ молюсками *L. stagnalis* та *M. edulis* спостерігали за дії іонів Cd при концентрації 10 мг/л [5, 15]. У той же час, вплив концентрації Cd 0,01 мг/л, яка відповідає природним умовам, не викликала суттєвих змін вмісту МТ в молюсках [5]. У досліджених нами водоймах концентрація Cd у воді не виходила за межі діапазону 0,01–0,78 мкг/л. Вміст кислоторозчинного Cd у донних відкладах більшості досліджених водойм не досягав аналітичної чутливості методу (<0,01 мг/кг). Лише у ставі м.Долина (Івано-Франківська обл.) концентрація металу досягала рівня 0,29±0,3 мг/кг. У цьому місці було виявлено молюсків з найвищим вмістом Cd (1,75±0,12 мкг/г). Таким чином, безпосереднього впливу хімічного складу компонентів навколишнього середовища на індукцію синтезу МТ виявлено не було. Основним фактором, який визначав вміст МТ у гепатопанкреасі, виявилася концентрація Cd, та частково Cu.

Граничні фонові рівні, перевищення яких в тканинах молюсків *L. stagnalis* свідчить про наявність забруднення, становлять для Cd – 0,9 мкг/кг; Zn – 91,0 мг/кг; Cu – 22,5 мг/кг [16]. Виявлені рівні накопичення Cd ставковиками показали перевищення фонові концентрації лише в трьох водоймах (двох з Івано-Франківської обл. та одного з Миколаївської обл.).

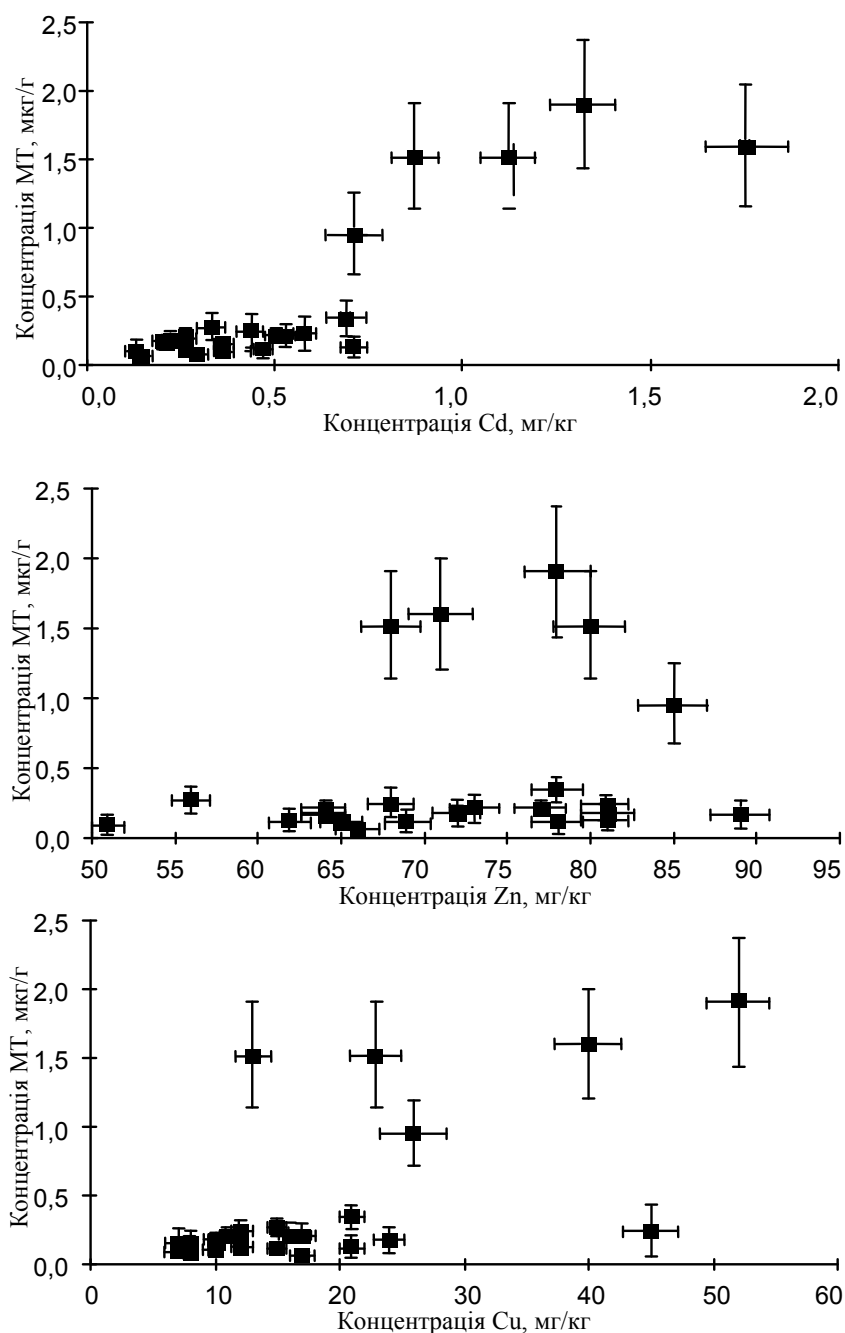


Рис. 1. Залежність вмісту металотіонейнів у гепатопанкреасі *L. stagnalis* від концентрації важких металів.

Підвищена концентрація Cu була характерна для молюсків з 6 водойм Західної України (Закарпатська, Івано-Франківська, Тернопільська та Хмельницька обл.) та Миколаївської обл. Причому часто молюски з підвищеним вмістом Cd також характеризувалися підвищеним вмістом Cu. Вміст Zn в молюсках з жодної дослідженої водойми не перевищував фонового рівня.

Порівняння з літературними даними показало, що виявлені величини вмісту МТ у тканинах ставковиків відповідають характерним рівням, встановленим для інших молюсків. Так, у лабораторних умовах за дії розчинів важких металів в тканинах молюсків *Mytilus edulis* реєстрували підвищення вмісту МТ від 0,08 мкг/г до 1,3 мкг/г [15]. У прісноводних молюсків *Anodonta grandis* з природних забруднених водойм

Квбеку концентрація МТ складала 0,14-0,36 мкг/г [3]. Фоновий рівень МТ в молюсках *M. edulis* з незабруднених районів становить 0,05 мкг/г [15].

Виявлений зв'язок між концентрацією Cd у тканинах молюсків та вмістом МТ свідчить про індукцію синтезу МТ в умовах підвищеного накопичення металу. Проте інтенсивний процес синтезу МТ у гепатопанкреасі ставковиків спостерігається лише при перевищенні порогового рівня цього металу, який відповідає 0,71 мг/кг. Молюски, вміст Cd в яких перевищував фоновий рівень (0,90 мг/кг), характеризувалися надзвичайно високим вмістом МТ. Також у п'яти з шести зареєстрованих випадків перевищення фонового рівня накопичення Cu, було відмічено підвищений вміст МТ. Можна припустити, що таке підвищення вмісту

Cu є вторинним внаслідок зв'язування цього металу молекулами МТ, індукція синтезу якого викликана підвищенням концентрації Cd у тканинах.

ВИСНОВКИ

Таким чином, можна вважати, що підвищення вмісту МТ в травній залозі молюсків *L. stagnalis* з ряду водойм свідчить про активацію механізмів захисту від токсичної дії хімічних складових середовища. Підтвердженням цього є реестрація в тканинах молюсків високих рівнів накопичення Cd та Cu, які перевищують встановлені фонові показники для незабруднених водойм України. Концентрацію Cd в тканинах ставковика в межах 0,13-0,71 мг/кг можна вважати фізіологічною нормою, оскільки за таких рівнів вміст МТ залишається стабільним і в середньому становить $0,18 \pm 0,03$ мкг/г.

Література

1. High K.A., Barthelet V.J., McLaren J.W., Blais J.S. Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) // Environm. Toxicol. Chem. – 1997. – Vol. 16, N 6. – P. 1111-1118.
2. Столяр О.Б., Фальфушинская Г.И., Базан О.Г. Сезонные особенности свойств металлотионеинов пресноводного двустворчатого моллюска *Colletopterum piscinale* (Unionidae) // Гидробиологический журнал. – 2007. – Т. 43, №4. – С. 98-108.
3. Couillard Y., Campbell P.G., Tessier A. Response of metallothionein concentrations in freshwater bivalve *Anodonta grandis* along on environmental cadmium gradient // Limnol. Oceanogr. – 1993. – Vol. 38, N 2. – P. 299-313.
4. Stillman M.J. Spectroscopic studies of copper and silver binding metallothioneins // Metal-based drugs. – 1999. – Vol.6, N4-5. – P. 277-290.
5. Leung K.M., Ibrahim H., Dewhurst R.E., Morley H.J., Crane M. Concentrations of metallothionein-like proteins and heavy metals in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* exposed to different levels of waterborne cadmium // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2003. – Vol.71. – P. 1084-1090.
6. Salanki J., Farkas A., Kamardina T., Rozsa K.S. Molluscs in biological monitoring of water quality // Toxicol. Lett. – 2003. – Vol.140-141. – P. 403-410.
7. Лукашев Д.В. Метод расчета фоновых концентраций тяжелых металлов в мягких тканях двустворчатых моллюсков для оценки загрязнения р. Днепр // Биол. внутр. вод. – 2007. – Т.4 – С.97-106.
8. Rainbow P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what // Envir. Pollut. – 2002. – Vol. 120. – P. 497-507.
9. Sheuhammer A.M., Cherian M.G. Quantification of metallothionein by silver saturation // Methods in Enzymology. – 1991. – Vol. 25. – P.78-83.
10. Leung K.M., Furness R.W. Induction of metallothionein in dogwhelk *Nucella lapillus* during and after exposure to cadmium // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 1999. – Vol.43. – P. 156-164.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Выш. шк., 1973. – С. 320 с.
12. Gundacker C. Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna // Environ. Poll. – 2000. – Vol. 110. – P.61-71.
13. Desonky M.M. Tissue distribution and subcellular localisation of trace metals in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role of lysosomal granules in metal sequestration // Aquat. Toxicol. – 2006. – Vol. 77, N 2. – P. 143-152.
14. Bebianno M.J., Langston W.J., Simkiss K. Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium // J. Marine boil. Ass. – 1992. – Vol. 75. – P. 173-186.
15. Roesijardi G., Unger M.E., Morris J.E. Immunochemical quantification of metallothioneins of a marine mollusk // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1988. – Vol.45. – P. 1257-1263.
16. Лукашев Д.В. Оценка фонового содержания тяжелых металлов в моллюсках *Lymnaea stagnalis* L. пресноводных экосистем Украины // Мат. III международной конференции Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы, Борок, 11-16 ноября 2008 г. – Борок: Ярославский печатный двор, 2008. – Ч.1. – С. 57-59.

МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ МОЛЛЮСКОВ КАК БИОХИМИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Лукашев Д.В.

Определено содержание металлотионеинов в пищеварительной железе моллюсков *Lymnaea stagnalis* L. из 24 различных водоемов Украины. Выяснено, что концентрация этих белков колеблется в пределах 0,07-1,90 мкг/г. Показана статистически значимая связь между концентрацией Cd и Cu в тканях моллюсков и содержанием металлотионеинов. При концентрации Cd в пределах 0,13-0,71 мкг/кг содержание металлотионеинов является стабильным и в среднем составляет $0,18 \pm 0,03$ мкг/г. Повышение концентрации Cd до 0,71-1,75 мг/кг приводит к резкому росту содержания металлотионеинов до 0,95-1,90 мкг/г.

Ключевые слова: металлотионеины, тяжелые металлы, загрязнение, водные экосистемы.

THE METALLOTIONEINS OF MOLLUSKS AS A BIOCHEMICAL INDICATOR OF POLYMETALLIC POLLUTION

Lukashov D.V.

The contents of metallothioneins in digestive gland of mollusks *Lymnaea stagnalis* L. from 24-th different water reservoir were defined. The concentration of these proteins varied within 0,07-1,90 mkg/g. The statistically significant relationship between concentration Cd and Cu in snail tissues and contents of metallothioneins was shown. At concentrations Cd within 0,13-0,71 mkg/kgs metallothionein contents is stable and at the average forms $0,18 \pm 0,03$ mkg/g. Increasing of Cd concentration prior to 0,71-1,75 mg/kgs brings about sharp growing of the metallothionein contents to 0,95-1,90 mkg/g

Key words: metallothioneins, heavy metals, environmental pollution, water ecosystems.