

УДК 577.352.38:577.64

Фальфушинська Г.І.¹⁾, Гнатишина Л.Л.¹⁾,
 Касянчук М.М.²⁾, Столяр О.Б.¹⁾

СПЕКТРАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ІЗОФОРМ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ МОЛЮСКА ЯК БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ РАНЬОГО ВИЯВЛЕННЯ ПРИРОДНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

- ¹⁾ Тернопільський національний педагогічний університет
 ім. В. Гнатюка, м. Тернопіль, Україна,
 e-mail: *oksana.stolyar@gmail.com*
- ²⁾ Тернопільський національний економічний університет,
 м. Тернопіль, Україна

Ключові слова: двостулковий молюск, металотіонеїни, УФ-спектри, мідь, цинк, забруднення води

Металотіонеїни (МТ) – це цитозольні білки, які вирізняються такими специфічними рисами як термостабільність, високий вміст цистеїну (до 30%) та металу, відсутність ароматичних амінокислотних залишків [9, 13]. МТ беруть участь у гомеостазі цинку та міді, детоксикації кадмію та індукуються ними, а тому вміст МТ у тканинах гідробіонтів рекомендують використовувати як біомаркер забруднення водного середовища важкими металами [11, 13]. Проте молюски, які є одними з найбільш популярних індикаторних організмів, можуть реагувати на забруднення зміною не лише вмісту МТ, але й їх якісного складу шляхом експресії різних ізоформ та співвідношення вмісту есенціальних та токсичних металів у їх складі [4, 5, 13]. Визначення цих характеристик МТ потребує тривалого часу та вартісного обладнання. Тому являє інтерес дослідити специфічні до складу металів характеристики УФ-спектрів МТ [1, 8, 14]. Досвід таких досліджень стосується переважно хребетних тварин та модельного впливу на них високих концентрацій певного виду йонів [2, 3, 16], а також реконструкції МТ *in vitro* за насичення апотіонеїнів металами [1] та не систематизований, а можливості використання їх показників у біомаркуванні практично не вивчені. Тому перспективним видається дослідити спектральні властивості ізоформ МТ молюска з природних водойм із різною якістю водного середовища.

Матеріали та методи

Дослідження проводились у травні, липні та вересні 2007 р. на особинах двостулкового молюска беззубки лебединої *Anodonta cygnea*

з довжиною мушлі 8,0 см і масою 50-60 г. із міського парку Топільче м. Тернополя після витоку р. Серет із Тернопільського ставу на штучних відгалуженнях річки (49°32' пн.ш., 25°36' сх.д.) (умовно чиста рекреаційна місцевість – Р) та нижньої течії р. Нічлава біля м. Борщів (48°48' пн.ш., 26°00' сх.д.) в районі інтенсивного аграрного виробництва (аграрна (А) місцевість). Тварин досліджували не більше, ніж через 24 год. після відбору.

МТ виділяли шляхом двоступеневої хроматографії на Сефадексі G-50 та ДЕАЕ-целюлозі із термостабільного екстракту тканин молюска беззубки, як було описано раніше [4]. Для дослідження використовували травну залозу і зябра молюска. 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 окиснення SH-груп та інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, “Sigma”). МТ ідентифікували як фракцію термостабільних білків з максимальним співвідношенням D_{254}/D_{280} [9]. Вимірювали УФ-спектри та вміст металів у об’єднаному елюаті окремих форм МТ (в об’ємі 15 мл). Результати подавали у вигляді диференційних спектрів: $(D_d - D_k)/D_k$, де D_d – оптичне поглинання дослідного зразку, а D_k – контрольного зразку при однаковій довжині хвилі.

Вміст міді та цинку у 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 вимірів на об’єднаних з 6 тварин зразках матеріалу. Кореляційний аналіз взаємозалежності диференційних спектрів МТ та Факторний аналіз вмісту металів у ізоформах МТ та показників світлопоглинання проводили з використанням пакетів програм Statistica v 7.0.

МТ-вмісні фракції, виділені шляхом гель-фільтрації [12], на етапі іонообмінної хроматографії утворюють дві головних ізоформи (рис. 1А), ідентифіковані як МТ-1 та МТ-2 згідно порядку виходу, що є типовою ознакою тваринних МТ [9] 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. В більшості випадків спостерігається поява додаткової фракції МТ-2а, що є типовим проявом мікрогетерогенності ізоформ тваринних МТ [17].

У спектрах форм МТ проявляються специфічні ознаки. Зокрема, у спектрах МТ-1 виражений максимум поглинання при 220-240 нм, а у МТ-2 – при 245-255 нм, що на підставі літературних даних [1, 7, 8]

дозволяє зробити припущення про різний склад металів цих форм (рис. 1Б).

Порівняння диференційних спектрів МТ тканин молюска більш наочно демонструє міжгрупові відмінності між ними та свідчить про зміни складу фракцій, пов'язані, у тварин із А-місцевості, з деструкцією унікальних тіолатних кластерів та набуттям МТ-2 травної залози ознак апоформи весною, а у тварин із Р-місцевості – з тіолдисульфідними переходами МТ-1 влітку та восени (рис. 2). Сезонні зміни спектральних властивостей МТ молюска з досліджуваних місцевостей протилежні для травної залози ($r=-0,8$, $p<0,01$) та подібні для зябер ($r=0,7$, $p<0,01$).

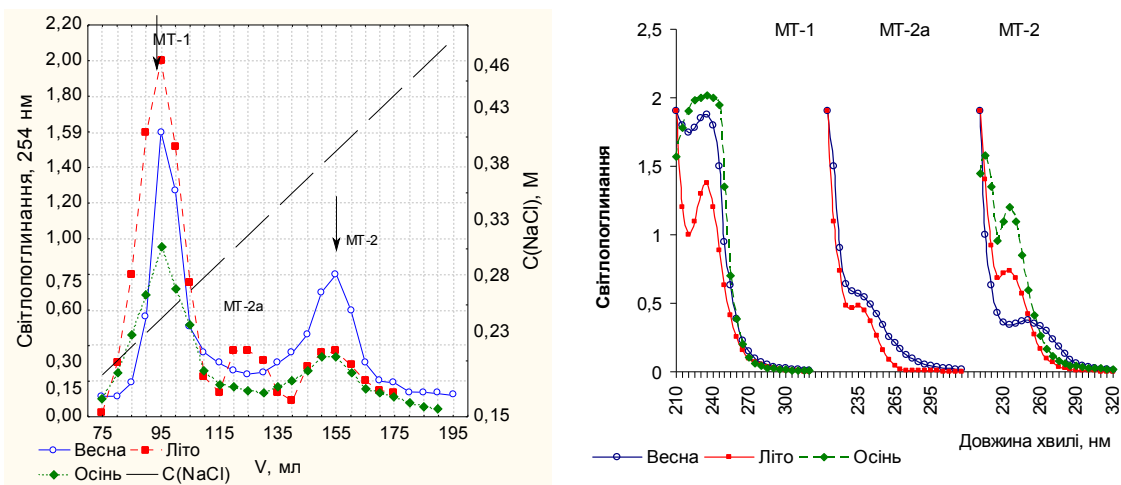


Рис. 1. Типові профіль елюції (А) та УФ-спектри (Б) металотіонеїнів тканин молюска, одержаних при іонообмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl в 0,01 М трис-НСl буфері, рН 8,0

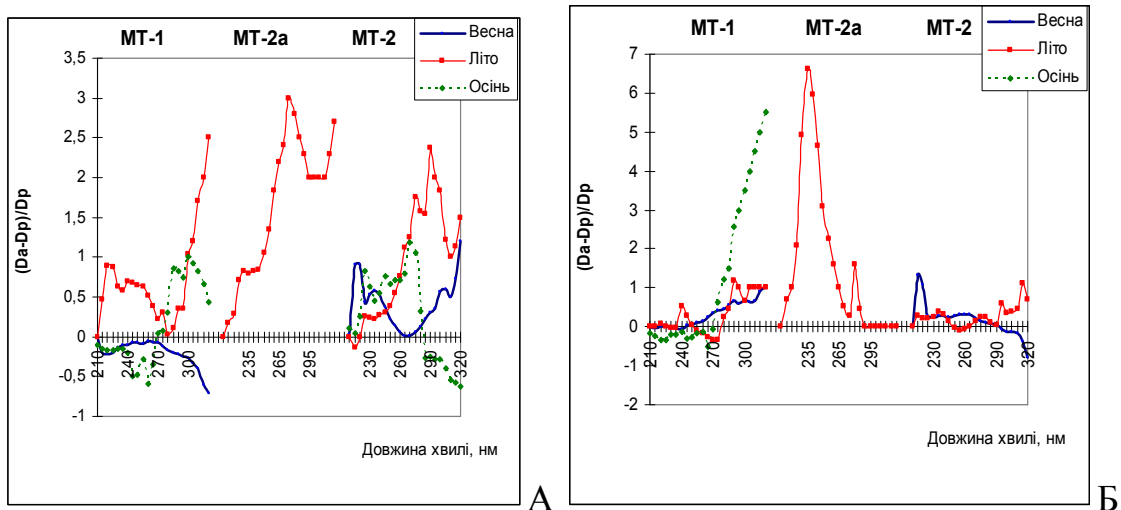


Рис. 2. Диференційні УФ-спектри ізоформ металотіонеїнів травної залози (А) та зябер (Б) молюска залежно від місцевості існування

Обчислення характерних для МТ співвідношень показників світлопоглинання [3, 9] свідчить (табл. 1), що для МТ молюсків травної залози із А-місцевості весною та Р-місцевості восени властивий вищий показник D_{245}/D_{295} в МТ-1 та D_{215}/D_{230} в МТ-2 обох тканин, порівняно з тваринами іншої дослідної групи. Відзначено і сезонні зміни характеристик спектрів. Зокрема, влітку та восени, порівняно з весняним періодом, відзначено зменшення показника D_{260}/D_{230} та D_{215}/D_{230} в обох досліджуваних місцевостях, особливо в МТ-2 тканин молюска та зростання показника D_{245}/D_{295} з максимумом восени в травній залозі та влітку в зябрах.

Таблиця 1. Співвідношення показників світлопоглинання металотіонеїнів тканин молюска із аграрної (А) та рекреаційної (Р) місцевостей

Показник, довжини хвилі	МТ-1		МТ-2а/2		МТ-1		МТ-2а/2	
	А	Р	А	Р	А	Р	А	Р
	Травна залоза				Зябра			
Весна								
215/230	0,9	1,0	3,5	2,8	1,0	1,0	4,9	2,6
260/230	0,2	0,2	0,6	0,9	0,3	0,2	0,8	0,7
254/280	10,4	9,3	2,8	2,7	5,9	7,7	3,2	2,7
245/295	66,7	53,6	7,8	7,7	25,0	38,7	11,5	8,6
Літо								
215/230	0,8	0,9	1,3	1,9	0,9	0,8	1,3	1,3
260/230	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
254/280	13,0	8,2	5,8	9,6	15,0	21,0	7,8	10,8
245/295	55,0	44,5	30,8	71,3	88,8	137,5	47,4	67,0
Осінь								
215/230	0,9	0,9	0,9	1,4	0,8	0,8	1,1	0,7
260/230	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
254/280	8,3	15,2	17,5	6,3	8,3	22,2	5,0	6,1
245/295	28,6	97,5	60,0	24,3	28,9	190,0	13,3	28,0

Оскільки відомо, що ізоформи МТ можуть відрізнятися за характером спектрів залежно від вмісту в них есенціальних металів [7, 8], було доцільно проаналізувати розподіл міді та цинку між ізоформами МТ. В складі МТ весною цинк за кількістю дорівнює міді, а в наступні сезони є головним металом у відповідності до появи смуги поглинання з максимумом 220-240 нм у спектрах. Вміст міді весною вищий в складі МТ травної залози молюсків з А-місцевості, а цинку – восени із Р-місцевості (табл. 2).

МТ вважаються перспективними біомаркерами стану оточуючого середовища, оскільки реагують на його забруднення збільшенням вмісту білка та/або м-РНК [13, 15]. Однак, є ряд робіт, в яких наводиться інформація щодо зменшення вмісту МТ у забруднених

місцевостях, зважаючи на те, що на етапі незворотних змін у клітині індукція синтезу МТ після досягнення піку у адаптивному діапазоні може повертатися до базального рівня, або навіть зменшуватися [6]. Це ускладнює інтерпретацію відповіді організму до високих рівнів забруднення. Тому видається перспективним досліджувати більш диференційовано відповідь МТ молюсків на якість водного оточення, а саме, на підставі аналізу фізико-хімічних властивостей. Як було показано, МТ молюсків, на відміну від інших гідробіонтів, характеризуються селективною індукцією ізоформ, зміною складу металів, особливостями профілю елюції залежно від місцевості існування [4, 5, 6].

Таблиця 2. Вміст есенціальних металів в металотіонеїнах тканин моллюска із аграрної (А) та рекреаційної (Р) місцевостей

Метал	МТ-1		МТ-2а/2		МТ-1		МТ-2а/2	
	А	Р	А	Р	А	Р	А	Р
	Травня залоза				Зябра			
	Весна							
Cu	40,6±4,2	10,9±1,1 ^b	29,7±3,0	21,1±2,1 ^b	23,4±2,2	21,9±2,2	14,8±1,2	9,4±1,0 ^b
Zn	31,9±3,1	17,5±1,3 ^b	37,4±4,1	17,2±1,6 ^b	32,8±3,2	25,8±2,2	5,1±0,5	9,4±0,9 ^b
Zn/Cu	0,8	1,6	1,3	0,8	1,4	1,2	0,3	1,0
	Літо							
Cu	0,9±0,1 ^a	2,6±0,2 ^b	4,5±0,4 ^a	7,2±0,5 ^{a,b}	1,8±0,2 ^a	1,9±0,2 ^a	5,5±0,5 ^a	7,3±0,6 ^b
Zn	17,3±1,4 ^a	18,5±1,6	25,0±2,4 ^a	17,6±1,5 ^b	21,9±2,1 ^a	20,2±1,9	50,4±5,1 ^a	20,1±2,1 ^{a,b}
Zn/Cu	19,2	7,1	5,6	2,4	12,2	10,5	9,2	2,9
	Осінь							
Cu	0,1±0,0 ^a	0,1±0,0	0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a	0,1±0,0 ^a	12,8±1,1	9,2±0,9 ^b
Zn	20,8±2,2 ^a	50,5±4,8 ^b	35,6±3,3	32,4±3,2 ^a	34,8±3,6	21,3±2,1	16,6±1,4 ^a	12,7±1,2 ^{a,b}
Zn/Cu	266,7	701,4	450,6	405,1	440,5	269,6	1,3	1,4

Примітка: ^a – відмінності між сезонами в одні групі, ^b – відмінності між дослідними групами в один сезон.

Особливий інтерес викликає робота [11], в якій встановлено, що у спектрі кругового дихроїзму стресорної метал-зв'язуючої ізоформи МТ-20 молюсків після насичення її кадмієм, в умовах *in vitro*, з'являються позитивні сигнали з максимумами 243 та 218 нм, які за відповідних умов у спектрі фізіологічної МТ-10 відсутні. Наведена інформація узгоджується з отриманими нами результатами. Зокрема, збільшення показників D_{215}/D_{230} та D_{245}/D_{295} молюсків із А-місцевості весною узгоджуються із збільшенням вмісту міді в МТ та, відображає небезпеку забруднення басейну Дністра сполуками міді, які є компонентами найбільш вживаних в даному регіоні пестицидів, саме весною, в пік агротехнічної активності. Збільшення вищезазначених показників у молюсків із Р-місцевості восени відбувається на тлі

збільшення в МТ вмісту цинку, який належить до пріоритетних забруднювачів водою урбанізованих територій. Одержані дані не випадкові і підтверджуються результатами паралельних експериментів з використанням мультимаркерного набору показників анодони [12].

Пошук взаємозв'язків між спектральними показниками ізоформ МТ і вмістом в них металів за допомогою факторного аналізу показав, що перша принципова компонента об'єднує 48,9% і 57,9% загальних варіацій, а друга – 23,9% і 20,9 відповідно у травній залозі та зябрах (рис. 3). Закономірності змін вмісту металів та спектральних показників в травній залозі виражені краще, ніж у зябрах. Зокрема, встановлено кореляцію між вмістом міді та співвідношенням показників світлопоглинання D_{260}/D_{230} у МТ-1 та МТ-2, що узгоджується із літературними даними про лінійну залежність змін оптичної густини при 260 нм та кількості зв'язаної міді до насичення при титруванні апотіонеїну кролика, у співвідношенні 1 моль металу – 0,25 оптичних одиниць густини [1]. З іншого боку, вміст міді в МТ-2 обернено пропорційний до показника D_{254}/D_{280} , що, очевидно, вказує на порушення металкластерної структури білка. Це може бути наслідком окиснення тіолових груп іонами міді з утворенням інтра- та інтермолекулярних дисульфідних зв'язків, яке найбільш ймовірно проходить в С-термінальному домені з високим ступенем термодинамічної стійкості [10].

Наведенні міркування підтверджуються результатами множинного регресійного аналізу, за яким простежується негативний зв'язок не лише між вмістом міді та показником D_{254}/D_{280} , але й D_{245}/D_{295} , який відображає область характерну для тіол-дисульфідних переходів. Залежність спектральних показників від вмісту металів у білку описується рівняннями: D_{254}/D_{280} (МТ-1) = $3,328 - 0,1677\text{Cu(МТ-1)**} + 0,4330\text{Zn(МТ-1)**} - 0,014\text{Zn/Cu(МТ-1)*}$ ($F(3,32)=20,126$; $p<0,000$) та D_{245}/D_{295} (МТ-1) = $-13,556 - 1,01\text{Cu(МТ-1)**} + 3,86\text{Zn(МТ-1)**} - 0,12\text{Zn/Cu(МТ-1)**}$ ($F(3,32)=91,061$; $p<0,000$). З наведених регресійних рівнянь та результатів факторного аналізу видно, що вміст цинку у МТ-1 корелює з оптичними показниками D_{254}/D_{280} та D_{245}/D_{295} , що можна трактувати як посилення цинк-зв'язуючої здатності за підтримки відновного стану в МТ [10]. Отже аналіз спектрів свідчить, що надлишок іонів міді у МТ молюсків посилює їх окисдаивну нестабільність та викликає окиснення тіолових груп МТ, а цинк сприяє зміщенню редокс-потенціалу пари SH-/SS в бік відновленої форми.

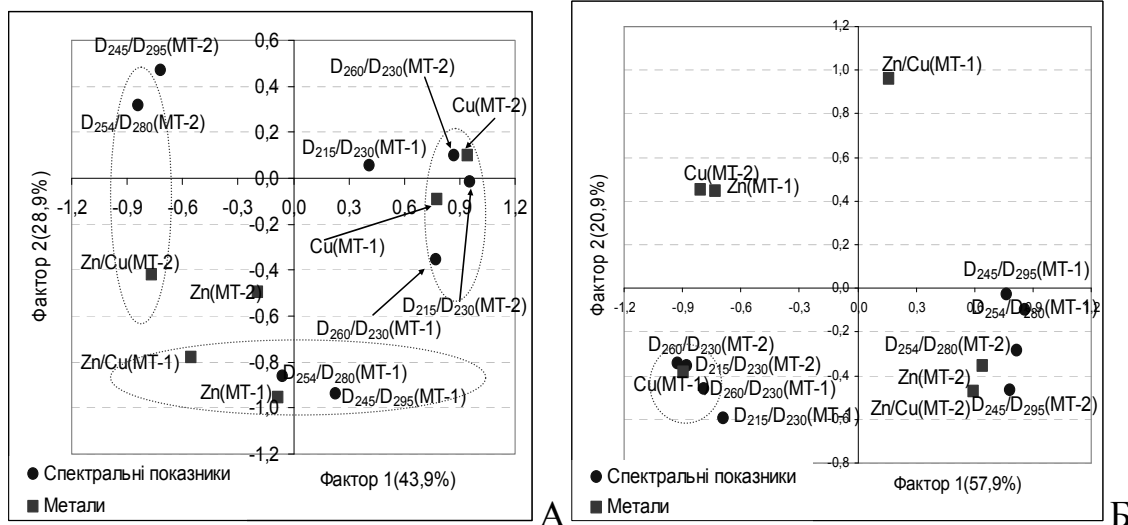


Рис. 3. Факторний аналіз вмісту металів та спектральних показників травної залози (А) та зябер (Б) двостулкового молюска з двох природних популяцій.

Підсумовуючи одержані результати слід відзначити, що для біомаркування більш доцільно використовувати показники травної залози. Збільшення показників D_{245}/D_{295} в МТ-1 та D_{215}/D_{230} в МТ-2 свідчить про специфіку забруднення водного середовища весною сполуками міді в А-місцевості (відповідно до збільшення частки зв'язаної з МТ міді) та сполуками цинку в Р-місцевості восени (відповідно до збільшення частки зв'язаної з МТ цинку). Зміни вмісту міді та співвідношення показників світлопоглинання D_{260}/D_{230} в МТ-2 травної залози та МТ-1 обох тканин узгоджуються. Зважаючи на відповідність наведених у роботі висновків результатам мультимаркерного аналізу [12], вважаємо за доцільне для попередньої оцінки якості води використовувати відносно мало затратний спосіб спектрального аналізу, як такий, що дозволяє диференціювати відповідь організму молюска на якість водного оточення.

Робота виконувалась за підтримки МОН України в межах Спільного Українсько-Французького науково-технічного проекту № М/93-2007 (EGIDE, PNC DNIPRO 14190ZC).

ЛІТЕРАТУРА

1. Мелконян В. З. Очистка и свойства медь-тионеина // Биохимия. – 1984. – Т. 49, № 6. – С. 928-931.
2. Столяр О. Б. Аналіз УФ-спектрів металотіонеїнів двостулкового молюска *Anodonta cygnea* як біотест забруднення води йонами металів // Наукові записки Тернопільського педуніверситету. Серія: Біологія. – 2003. – №3-4(22). – С. 100–104.
3. Столяр О. Б., Фальфушинская Г. И., Базан О. Г. Сезонные особенности свойств металлотионеинов пресноводного двустворчатого моллюска *Colletopterum*

- pictinale* (Unionidae) // Гидробиологический журнал. – 2007. – Т. 43, № 4. – С. 98–108.
4. 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.
 5. 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.
 6. Dallinger R., Wang Y., Berger B. et al. Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia* // European Journal of Biochemistry. – 2001. – Vol. 268, №15. – P. 4126–4133.
 7. Das K., Debacker V., Bouquegneau J. M. White-sided dolphin metallothioneins: purification, characterisation and potential role // Comparative Biochemistry and Physiology Part C. – 2002. – Vol. 131C, № 3. – P. 245–252.
 8. Falfushynska H.I., Delahaut L., Stolyar O.B. et al. Multi-biomarkers approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister basin (Ukraine) // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. - *In press*. DOI: 10.1007/s00244-008-9234-2.
 9. Kagi J. H. R., Schaffer A. Biochemistry of metallothionein // Biochemistry. – 1988. – Vol. 27, N 23. – P. 8509–8515.
 10. Maret W., Vallee L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters // Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. – 1998. – Vol. 95. – P. 3478–3482.
 11. Münger K., Germann U. A., Beltramini M. et al. (Cu,Zn)-Metallothioneins from Fetal Bovine Liver. Chemical and spectroscopic properties // Journal of Biological Chemistry – 1985. – Vol. 260, N 18. – P. 10032–10038.
 12. 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*) // Aquatic Toxicology. – 2003. – Vol. 64, N 3. – P. 359–362.
 13. Roesijadi G. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals // Environmental Health Perspectives. – 1994. – Vol. 102, № 12. – P. 91–96.
 14. Stolyar O., Falfushynska H. The metallothioneins UV-spectra analysis as a tool for the estimation of the metal toxicity for freshwater animals // Toxicology Letter. – 2003. – Vol. 144, Supplement 1. – S. 169–S170.
 15. Vergani L., Grattarola M., Grasselli E. et al. Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2007. – Vol. 465, N 1. – P. 247–253.
 16. 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 Elements in Man and Animals 10. – Springer US, 2000. – P. 1103-1105. – ISBN 978-0-306-46378-5 (Print) 978-0-306-47466-8.
 17. Zorita I., Bilbao E., Schad A. et al. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by *in situ*

hybridization and RT-PCR // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2007. – Vol. 220, N 2. – P. 186–196.

**Г.И. Фальфушинская, Л.Л. Гнатишина, М.Н. Касянчук,
О.Б. Столяр**

**СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИЗОФОРМ
МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ МОЛЛЮСКА КАК
БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ
ПРИРОДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

Ключевые слова: двустворчатый моллюск, металлотioneины, УФ-спектры, медь, цинк, загрязнение воды

Исследовались спектральные свойства и содержание металлов в металлотioneинах (МТ) пищеварительной железы и жабр двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* из аграрной (А) и рекреационной (Р) местностей бассейна реки Днестр в три сезона. Соотношение показателей светопоглощения D_{245}/D_{295} МТ-1 пищеварительной железы и D_{215}/D_{230} МТ-2 обеих тканей выше в А-местности весной и Р-местности осенью, чем в группе сравнения и в соответствии с увеличением уровня соответственного металла в МТ, что, очевидно, отражает загрязнение А-местности соединениями меди и Р-местности – соединениями цинка. Факторный анализ подтверждает корреляцию между содержанием меди и спектральным показателем D_{260}/D_{230} в МТ-2 пищеварительной железы и МТ-1 обеих тканей. Показатели пищеварительной железы более чувствительны к качеству воды, чем показатели жабр.

H. I. Falfushynska, L.L. Gnatyshyna, M. M. Kasyanchuk, O.B. Stoliar
**SPECTRAL INDICES OF BIVALVE METALLOTHIONEINE
ISOFORMS AS BIOCHEMICAL MARKERS OF EARLY
IDENTIFICATION OF ENVIRONMENTAL POLLUTION**

Key words: bivalve mollusk, metallothioneins, UV-spectra, copper, zinc, water pollution

The article examines spectral properties and metal content in MTs of the digestive gland and gills of the bivalve mollusc *Anodonta cygnea*, a representative species of agricultural (A) and recreational (R) sites of the Dnister River. The ratio of absorption values of D_{245}/D_{295} in MT-1 from the digestive gland and D_{215}/D_{230} in MT-2 from both tissues was higher at A-site in spring and at R-site in autumn compared to the control group, and corresponded with higher metal levels in MTs; this could be caused by pollution at A-site and zinc pollution at R-site. Factor analysis confirms the correlation between copper content and spectral index D_{260}/D_{230} in MT-2 of the digestive gland and MT-1 of both tissues. The digestive gland parameters are more sensitive to water quality than those of gills.