

УДК [504.064:577.25](564.141)

## ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ АКУМУЛЯЦІЇ МЕТАЛІВ МЕТАЛОТІОНЕЇНАМИ ТРАВНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЕГЕНЕВОГО МОЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*

Гнатишина Л. Л.<sup>1,2</sup>

**Вплив іонізуючого випромінювання на ефективність акумуляції металів металотіонеїнами травної залози легеневого моллюска *Lymnaea stagnalis*.** — Л. Л. Гнатишина. — Проведено порівняльне дослідження вмісту металів (Zn, Cu, Cd) у металотіонеїнах (MT) легеневого моллюска *Lymnaea stagnalis* та участі MT у розподілі металів у тканині травної залози за гострої дії іонізуючого випромінювання (2 мГр). Встановлено, що опромінені моллюски втрачають здатність акумулювати цинк та кадмій в складі MT, тоді коли вміст металів у тканині зростає. Загалом металодепонувальна здатність MT ставковика порівняно із загальним вмістом металів у тканині зменшується на 64,8%. Обчислення співвідношення металів (Cu+Zn):Cd свідчить про збільшення частки потенційно токсичного кадмію як у тканині травної залози (на 53,8%), так і у складі MT (на 71,1%). Отримані результати характеризують MT як перспективний біомаркер неспецифічної реакції на стрес в організмі моллюска.

**Ключові слова:** *Lymnaea stagnalis*, купрум, цинк, кадмій, металотіонеїн, іонізуюче випромінювання.

**Адреса:** <sup>1</sup> – ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського», 46001, Тернопіль, вул. Майдан Волі, 1, Україна, <sup>2</sup> – Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, 46027, Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: lesyafoxy@i.ua; http://biochemlab.tnpu.edu.ua.

**The effects of ionizing radiation on the metal accumulation efficiency of metallothionein in the digestive gland of pulmonate mollusk *Lymnaea stagnalis*.** — L. L. Gnatyshyna. — The comparative study of the metals content (Zn, Cu, Cd) in metallothionein (MT) of pulmonary mollusk *Lymnaea stagnalis* and participation in the metals distribution in the digestive gland tissue under the action of acute low doses of ionizing radiation (2 mGy) was conducted. It was shown that MT of radiation-exposed mollusk loses their accumulation ability to zinc and cadmium, whereas the metals content increases in the digestive gland tissue. Overall metal-binding ability of MT in pond snail decreased by 64.8% compared to the total metals content in the tissue. Calculate the ratio of metals (Cu + Zn): Cd suggests increasing the proportion of potentially toxic cadmium as in the tissue of the digestive gland (by 53.8%) and as part of MT (by 71.1%). The results describe MT as a perspective biomarker of nonspecific response to stress in the body of the mollusk.

**Key words:** *Lymnaea stagnalis*, copper, zinc, cadmium, metallothionein, ionizing radiation.

**Address:** <sup>1</sup> – I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University, 46001, Ternopil, Maydan Voli, 1, Ukraine, <sup>2</sup> – Ternopil V. Hnatiuk National Pedagogical University, 46027, Ternopil, Kryvonosa Str., 2, Ukraine e-mail: lesyafoxy@i.ua; http://biochemlab.tnpu.edu.ua.

### Вступ

Серед багатьох проблем радіаційного забруднення, що виникли після аварії на Чорнобильській АЕС, однією з найбільш важливих є оцінка пролонгованого ефекту випромінювання малими дозами на біологічні системи. Цей ефект може бути як «замаскований», так і моделюватися іншими пошкоджуючими чинниками [2; 13]. Відтак, інтерес наукової спільноти все частіше орієнтований на відсутність чітких критеріїв діагностики радіаційного забруднення [3; 6; 8; 9; 13], яка ґрунтується здебільшого на дослідженні накопичення радіоактивних частинок в організмі, наприклад, у черепашці моллюска [9]. Менша увага приділяється пошукам джерел іонізуючого випромінювання [19; 20], пов'язаних із впливом різноманітних факторів фізичної та/або хімічної природи, в тому числі впливу важких металів [8].

Ставковик звичайний *Lymnaea stagnalis* належить до найбільш розповсюджених прісноводних легеневих моллюсків, які населяють природні біотопи Західної України [7; 17]. Вважають, що даний вид моллюсків є досить толерантним до умов середовища у порівнянні з двостулковими [2] та характеризується здатністю накопичувати великі кількості забруднювачів середовища, у першу чергу, важких металів [4; 5].

Незважаючи на численні дослідження металодепонувальної функції стресорних протеїнів металотіонеїнів (MT) [7; 11] та участі у їх перерозподілі металів, інформація стосовно прісноводних моллюсків обмежена, а різноманіття відповідей, відомих для цих білків, не проаналізовані системно. Зокрема, дані, що стосуються вивчення акумулюючої здатності MT ставковика, потребують детальнішого розгляду з точки зору впливу факторів різного походження, у тому числі іонізуючого випромінювання, яке може значно модулювати варіабельність відповіді цих білків [6; 12]. У

зв'язку із цим, актуальним є дослідження впливу малих доз іонізуючого випромінювання на акумулюючу здатність металотіонейнів легеневого моллюска.

### Матеріал та методи дослідження

Для дослідження відбирали ставковика звичайного *Lymnaea stagnalis* (Linne, 1758) з висотою черепашки 40–55 мм і загальною масою 3,8–4,3 г та без ознак наявності трематод, що встановлювали мікроскопічно [1]. На території України моллюсків відбирали з умовно чистої місцевості у верхній ділянці річки, де поблизу відсутня інтенсивна антропогенна діяльність, ведеться традиційне сільське господарство (49°46'08" пн. ш. 25°05'23" сх. д., с. Івачів, вище м. Тернопіль по р. Серет). Обрана місцевість Тернопільської області відноситься до зони з мінімальним рівнем радіаційного забруднення (до 10 мкР/год), що відповідає природньому радіаційному фону згідно даних Тернопільського обласного лабораторного центру держсанепідслужби України [<http://terses.gov.ua/index.php>].

З особин ставковика формували 2 групи: одна – контрольна, інших особин піддавали гострому впливу іонізуючого випромінювання у дозі 2 мГр (група Р (2 мГр)). Опромінення здійснювали одноразово за допомогою рентгенівського апарату РУМ-20 у дозі 2 мЗв (мілізіверти) або 2 мГр – поглинута доза; фільтри 0,5 мм Cu і додатковий фільтр – 0,5 мм Zn, напруга – 40 кВ, сила струму – 80 мА; фокусна відстань від рентген-апарату – 40 см, потужність дози 1 Р/с, час експозиції – 2 с. Експозицію проводили у безводному середовищі у пластикових коробках. Моллюсків досліджували на сьому добу після опромінення.

**Аналіз металотіонейнів за якісними та кількісними характеристиками.** МТ виділяли хроматографічно з термостабільного екстракту, який одержували з 10%-ого гомогенату тканини у 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0 з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу (“Sigma”) та фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, “Sigma”). Здійснювали гель-розподільчу хроматографію на сефадексі G-50 [13], як було описано раніше [11]. МТ ідентифікували як низькомолекулярні термостабільні білки із високим показником співвідношення світлопоглинання  $D_{254}/D_{280}$  [20]. Кількісно МТ характеризували за вмістом металів (МТ-Ме), використовуючи модифіковане рівняння Гамільтона:

$$m(\text{MT-Me})=0,5(v(\text{Zn})\cdot M(\text{MT})/7+v(\text{Cu})\cdot M(\text{MT})/12) 18].$$

**Визначення вмісту металів.** Вміст міді, цинку у тканині травної залози, фракціях МТ моллюсків вимірювали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті у співвідношенні 1:5 (маса:об'єм) і визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115, а вміст кадмію – на спектрофотометрі S-600 і виражали в мкг на г вологої маси тканини.

Результати вимірів у гомогенатах тканини подані у вигляді  $M \pm m$  для 8 тварин та хроматографічних фракцій –  $M \pm m$  для трьох вимірів у зразку тканини із об'єднаних наважок з п'яти тварин дослідної групи. Вірогідність відхилення двох рядів значень

обчислювали з використанням t-тесту Стьюдента. Вірогідним вважали відмінність між рядами за  $P < 0,05$ .

### Результати дослідження та їх обговорення

У ході нашого дослідження вплив іонізуючого випромінювання у дозі 2 мГр через 6 діб після експозиції у дослідній групі викликав високу смертність моллюсків у порівнянні з контролем. Зокрема, сумарна летальність становила 16 екз. з 39 (41 %). У літературі не повідомляється про чутливість ставковика до умов експериментального опромінення, проте в паралельному дослідженні двостулкові моллюски *Anodonta anatina* виявилися витривалішим видом до отриманої дози радіації [13].

Розподіл форм термостабільних білків ставковика при гель-хроматографії представлено на рис. 1. Так, за дії іонізуючого випромінювання у дозі 2 мГр профіль елюції відповідав контролю, а виділена низькомолекулярна МТ-вмісна фракція з молекулярною масою близько 10 кДа відповідала критеріям термостабільності та типовим характеристикам УФ-спектру, що свідчить про порівняно високий показник співвідношення  $D_{254}/D_{280}$ , який становить  $2,0 \pm 0,2$  у контролі та  $3,7 \pm 0,1$  у дослідній групі [14]. Отже, за хроматографічними характеристиками МТ ставковика виявилися толерантними до дії радіації та не проявляють ознак гетерогенності.

Визначення складу металів в МТ та тканині (табл. 1) свідчить, що за дії іонізуючої радіації спостерігається найпомітніші зміни у перерозподілі цинку та кадмію. Відтак, у моллюсків дослідної групи вміст цинку збільшується у тканині травної залози, що поєднується з вивільненням його з металотіонейнів та зменшенням акумулювальної здатності протеїнів з 38,2% у контролі до 9,4%. Незважаючи на незначне збільшення вмісту кадмію в МТ моллюсків дослідної групи, зростає надлишок його недепонованої форми, за участі якої, ймовірно, відбувається блокування функціональних груп, наприклад, тіолів [16]. Також обрахунок співвідношення есенціальних металів до неесенціальних (Cu+Zn):Cd, як показника їх гомеостазу, свідчить про збільшення частки потенційно токсичного кадмію як у тканині травної залози (на 53,8 %), так і у складі МТ (на 71,1%) опромінених моллюсків порівняно з контролем. Разом з тим МТ опромінених моллюсків ефективніше акумулюють мідь.

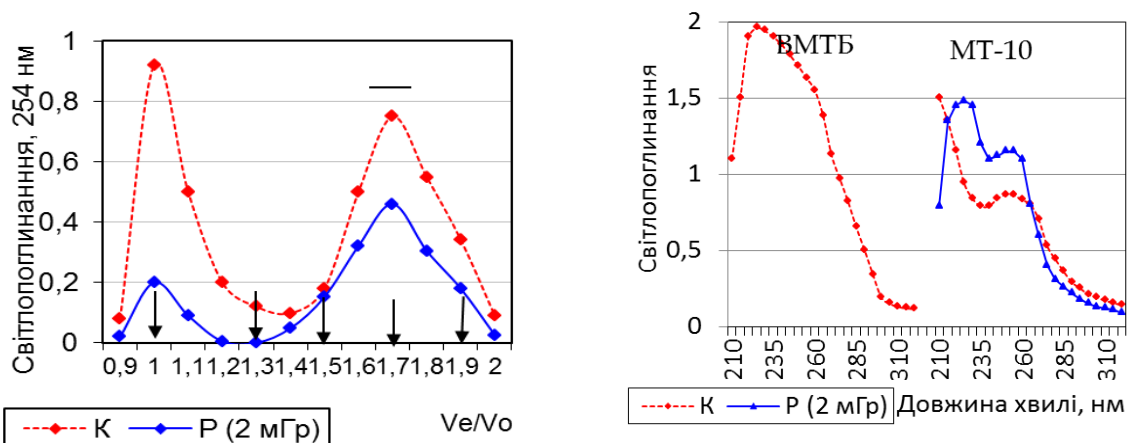
Тому порівняння вмісту металів у складі МТ, як основного клітинного депо для цинку, міді та кадмію, дає важливу інформацію про потенційну токсичність металу, ніж дані про його загальний вміст у тканині.

Як відомо, дослідження металодепонувальної функції МТ є важливою передумовою формування адаптивної відповіді організму на фактори середовища існування [11]. З літературних джерел відомо про дослідження ефективності депонування металів МТ у поєднанні з дією іонізуючого випромінювання [6; 12], та подекуди такі дані носять суперечливий характер. Наприклад, дослідження комбінованої дії гамма-опромінення (75 мГр) і металів (Al + Cd) в атлантичного лосося (*Salmo salar* L.) показало посилення активності транскрипції генів, що кодують білки у відповідь на стрес, а саме: каспази,

глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, металотіонеїну та убіквітину [10].

Разом з тим відзначено [15], що у піддослідних мишей за впливу рентгенівського випромінювання у діапазоні доз від 1 до 80 Гр, експресія МТ-1 не пов'язана із перерозподілом металів у МТ оскільки у різних групах вміст цинку в складі протеїну суттєво не відрізнявся від базального. У ході нашого дослідження показано (рис. 2), що за експериментальної дії малої дози іонізуючого випромінювання відмінною реакцією МТ

ставковика є втрата його металодепонувальної здатності на 64,8% у порівнянні із контрольною групою. У нашій попередній роботі [17] за дії такого ж опромінення було показано вірогідне зменшення загального вмісту МТ-SH, визначеного за кількістю тіолових груп, порівняно з контролем на 45,5%, що свідчить про неспецифічний ефект, як, очевидно, пригнічення цієї детоксикаційної системи за низьких доз радіації і узгоджується із даними про низький вміст МТ-SH у молюсків із зони ЧАЕС [17].



**Рис. 1.** Профілі елюції (А) та УФ-спектри (Б) при гель-розподільчій хроматографії на сефадексі G-50 термостабільного екстракту травної залози легеневого молюска за дії радіоактивного випромінювання (доза 2 мГр).

*Примітка.* Стрілками вказано об'єм елюції маркерів: 1,0  $V_e/V_o$  – (25,8 кДа), 1,3  $V_e/V_o$  – (17,0 кДа), 1,5  $V_e/V_o$  – (12,3 кДа), 1,7  $V_e/V_o$  – (8,6 кДа), 0,96  $V_e/V_o$  – (3,4 кДа);  $V_e$  – об'єм елюції,  $V_o$  – зовнішній об'єм гелю.

ВМТБ – відповідає виходу високомолекулярної фракції, МТ-10 – фракція з  $M_r$  10 кДа.

**Fig. 1.** Gel-filtration chromatography elution profiles (A) on Sephadex G-50 of the thermostable extract from digestive gland of pulmonate and UV-spectra (B) exposed to ionizing radiation (2 mGy).

*Note.* Arrows indicate the elution volume of markers: 1,0  $V_e/V_o$  – (25,8 kDa), 1,3  $V_e/V_o$  – (17,0 kDa), 1,5  $V_e/V_o$  – (12,3 kDa), 1,7  $V_e/V_o$  – (8,6 kDa), 0,96  $V_e/V_o$  – (3,4 kDa);  $V_e$  – elution volume,  $V_o$  – void volume of the column.

HMWC – high molecular weight thermostable proteins, MT-10 – fraction with  $M_r$  10 kDa.

**Таблиця 1.** Вміст металів у тканині та металотіонеїнах травної залози ставковика *Lymnaea stagnalis* з умовно чистої місцевості та за дії на організм іонізуючого випромінювання, мкг/г вологої тканини (%), частка від загального вмісту),  $M \pm m$ ,  $n=8$

**Table 1.** The metals content in the tissue of the digestive gland and metallothionein of pond snail *Lymnaea stagnalis* from pristine site and under the action of ionizing radiation, mg/g FW (%), accumulation degree of metal),  $M \pm m$ ,  $n=8$

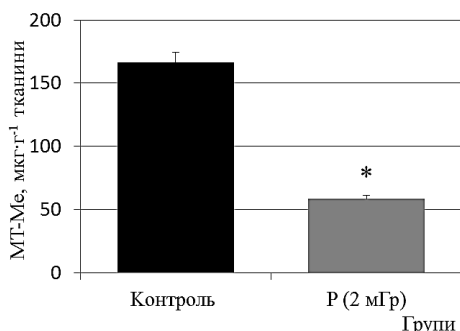
Метали	Групи	Загальний вміст	Металотіонеїни
Cu	Контроль	7,54±0,89	1,12±0,10 (14,9%)
	Р (2мГр)	7,53±0,72	1,47±0,12* (19,5%)
Zn	Контроль	44,19±4,18	16,90±1,55 (38,2%)
	Р (2мГр)	62,42±3,77*	5,86±0,45* (9,4%)
Cd	Контроль	1,23±0,29	1,20±0,12 (97,6%)
	Р (2мГр)	3,60±0,19*	1,69±0,15* (46,9%)

Примітка. Тут і на рис. 2: \* – відмінність між контролем та дослідною групою вірогідна,  $p < 0,05$ .

Вважають, що механізми впливу іонів металів та іонізуючої радіації на експресію МТ відмінні: вплив металів опосередковується взаємодією факторів

транскрипції з регуляторними ділянками генів МТ, а збільшення рівня МТ під впливом іонізуючого випромінювання пов'язане з ампліфікацією генів МТ і є

ознакою порушень нормального процесу реплікації ДНК [3].



**Рис 2.** Вміст металотіонінів (MT-Me), визначених за кількістю металів, у травній залозі ставковика звичайного *Lymnaea stagnalis* за дії іонізуючого випромінювання (2 мГр),  $n=8$ .

**Fig. 2.** Metallothioneins content measured by metals content in the digestive gland of pond snails *Lymnaea stagnalis* under the influence of ionizing radiation (2 mGy),  $n=8$ .

Отже, згідно отриманих даних можна говорити про опосередкований взаємозв'язок дії іонізуючого випромінювання на металодепонувальну функцію МТ ставковика, що потребує детальнішого дослідження механізму їх впливу для формування адаптивної відповіді організму за дії низьких доз радіації.

## Висновки

Проведене дослідження показало, що *Lymnaea stagnalis* є чутливим видом до дії радіаційного забруднення, а металодепонувальна функція МТ моллюска є вагомим показником для з'ясування наслідків даного типу забруднення в умовах природного середовища. Отримані результати характеризують МТ як перспективний біомаркер неспецифічної реакції на стрес у організмі моллюска.

Робота виконувалась за підтримки МОНУ (НДР № Ф29/321-2009 та № 131 Б).

- Гинецинская Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция / Т. А. Гинецинская. – Ленинград, 1968. – 425 с.
- Голубев А. П. Общая термоустойчивость и радиоустойчивость популяций *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) из водоемов с разными формами антропогенной загрузки / А. П. Голубев // Доклады Академии наук. – 1995. – Т. 342, № 2. – С. 280–283.
- Данилин И. А. Участие металлотіонінів в формировании ответной реакции растительных и животных клеток на действие  $\gamma$ -излучения и ионов кадмия: автореф. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.01 «Радиобиология» / И. А. Данилин; Всерос. науч.-исслед. ин-т с.-х. радиологии и агроэкологии РАСХН. – Обнинск, 2004. – 12 с.
- Киричук Г. Е. Особенности накопления ионов тяжелых металлов в организме пресноводных моллюсков / Г. Е. Киричук // Гидробиологический журнал. – 2006. – Т. 42. – С. 99–110.
- Лукашов Д. В. Металотіоніни моллюсків як біохімічні індикатори поліметалічного забруднення / Д. В. Лукашов // Фізика живого. – 2010. – Т. 18, № 1. – С. 76–80.
- Пинкина Т. В. Влияние тяжелых металлов на биологические характеристики прудовика озерного (*Lymnaea stagnalis* L.) из водоемов с различным уровнем радионуклидного загрязнения / Т. В. Пинкина // Гидробиологический журнал. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 107–117.
- Роль металотіонінів у адаптації легеневого моллюска *Lymnaea stagnalis* до забруднення середовища / Л. Л. Гнатишина, Г. І. Фальфушинська, О. П. Голубев [та ін.] // Гидробиологический журнал. – 2011. – Т. 47, № 3. – С. 58–68.
- Adaptive response to ionising radiation induced by cadmium in zebrafish embryos / V. W. Choi, C. Y. Ng, M. K. Kong [et al.] // Journal of Radiological Protection. – 2013. – Vol. 33, N 1. – P. 101–112.
- Application of molluscs for radioecological monitoring of the Chernobyl outburst / L. Frantsevich, A. Kornushin, I. Pankov [et al.] // Environmental Pollution. – 1996. – Vol. 94, N 1. – P. 91–100.
- Effects of combined gamma-irradiation and metal (Al+Cd) exposures in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / P. A. Olsvik, L. S. Heier, B. O. Rosseland [et al.] // Journal of Environmental Radioactivity. – 2010. – Vol. 101, N 3. – P. 230–236.
- Falfushynska H. Function of metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine / H. Falfushynska, O. Stolyar // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2009. – Vol. 72, N 5. – P. 1425–1432.
- Hawas A. M. Effect of low dose gamma rays on certain essential metals and oxidative stress in different rat organs / A. M. Hawas // Journal of Radiation Research and Applied Sciences. – 2013. – Vol. 6, N 2. – P. 38–44.
- Interpopulational variability of molecular responses to ionizing radiation in freshwater bivalve *Anodonta anatina* (Unionidae) / H. Falfushynska, L. Gnatyshyna, I. Yurchak [et al.] // Science of the Total Environment. – 2016. – in press.
- Kagi J. H. R. Biochemistry of metallothionein / J. H. R. Kagi, A. Schaffer // Biochemistry. – 1988. – Vol. 27, N 23. – P. 8509–8515.
- Koropatnick J. Organspecific metallothionein induction in mice by X-irradiation / J. Koropatnick, M. Leibbrand, M. G. Cherian // Radiation Research. – 1989. – Vol. 119, N 2. – P. 356–365.
- Maret W. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair / W. Maret // J. Nutr. – 2003. – Vol. 133, N 5. – P. 1460S–1462S.
- Metallothionein and glutathione in *Lymnaea stagnalis* determine the specificity of responses on the effects of ionising radiation / L. Gnatyshyna, H. Falfushynska, O. Bodilovska [et al.] // Radioprotection. – 2012. – Vol. 47, N 2. – P. 231–242.
- Metallothioneins in liver of *Rutilus rutilus* exposed to  $\text{Cu}^{2+}$ . Analysis by metal summation, SH determination and spectrofluorimetry / S. Paris-Palacios, S. Biagianti-Risbourg, A. Fouley, G. Vernet // Comparative Biochemistry and Physiology. – 2000. – Vol. 126 C, N 2. – P. 113–122.
- Godoy J. M.  $^{210}\text{Po}$  concentration in *Perna perna* mussels: looking for radiation effects / J. M. Godoy, M. S. de Oliveira, C. E. B. de Almeida [et al.] // Journal of Environmental Radioactivity. – 2008. – Vol. 99, N 4. – P. 631–640.
- Suzuki K. T. Purification of vertebrate metallothioneins / K. T. Suzuki // Methods in Enzymology. – 1991. – Vol. 205. – P. 252–263.

Отримано: 4 червня 2016 р.

Прийнято до друку: 16.06.2016