



УДК : [504.064:577.25](564.141)

ВПЛИВ ПОБУТОВИХ ЗАБРУДНЮВАЧІВ НА СТАН МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ У ТКАНИНАХ ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА *UNIO TUMIDUS*

**Г. І. Фальфушинська^{1,2}, Л. Л. Гнатишина^{1,2},
Л. П. Копаниця¹, Л. Д. Романчук¹, О. Б. Столяр¹**

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна
e-mail: Oksana.Stolyar@gmail.com; <http://biochemlab.tnpu.edu.ua>

²Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського
вул. Майдан Волі, 1, Тернопіль 46001, Україна

Засоби особистого вжитку та фармацевтичні препарати належать до найбільш типових і складно прогнозованих за своїм впливом сучасних забруднювачів водойм. Очікується, що вони можуть модулювати активність молекулярних систем детоксикації організму. Оскільки продукція металодепонувального протеїну металотіонеїну (МТ) активується широким колом стресорних чинників, метою дослідження стало порівняння функціональних характеристик МТ травної залози (ТЗ) двостулкового молюска *Unio tumidus* чоловічої статі за модельного впливу поширених побутових забруднювачів водойм ібупрофену (І, 250 нг/л), триклозану (Т, 500 нг/л) або естрону (Е1, 100 нг/л) протягом 14 діб із цими характеристиками в екземплярів із природних умовно чистої (контроль) і хронічно забрудненої водойми (загальний термін перебування у лабораторних умовах – 21 доба). Виявлено підвищений вміст цинку, міді та кадмію у тканинах ТЗ, гонад та у складі МТ і зменшений загальний вміст МТ у тканині ТЗ двостулки із забрудненої водойми порівняно з контролем. Експериментальні чинники, як і хронічне забруднення, зумовлюють збільшення вмісту цинк-депонувальної форми МТ, яке відбувається на тлі зменшення (І-, Т-групи), або збільшення (Е1-група) загального вмісту протеїну МТ і незмінного загального вмісту цинку та міді у тканині. У гонадах за впливу І, Т й Е1 відзначено зменшення вмісту міді та збільшення (у 2,2–3 рази) вмісту цинку. Відтак, зростання вмісту цинк-зв'язаного МТ у ТЗ двостулки можна вважати складовою неспецифічної стратегії забезпечення сигнальної функції цих іонів за впливу пошкоджувальних чинників.

Ключові слова двостулковий моллюск, ібупрофен, триклозан, естрон, металотіонеїни, цинк.

ВСТУП

Протягом останнього десятиліття спостерігається кардинальна зміна у структурі біоагроз водного середовища: на зміну забруднювачам, які надходять із відомих

джерел у значних кількостях, типовим стає спонтанне забруднення з розсосереджених джерел, що містить переважно засоби особистого вжитку і фармацевтичні препарати у низьких наномольних концентраціях (<http://www.gwp.org/en/GWP-CEE/about>). Такі побутові забруднювачі становлять небезпеку як у малих поселеннях, де у Центральній і Східній Європі мешкають близько 30 % населення, а очищення стічних вод узагалі не здійснюється, так і у мегаполісах, водоочисні системи яких не здатні ефективно очищувати стічні води від низки таких речовин (<http://www.ooskanews.com>).

Молекулярні відповіді на вплив несприятливих факторів на організм можна класифікувати як специфічні до природи чинника та неспецифічні реакції на стрес [22]. Їхні типові прояви покладено в основу біоіндикації якості водного середовища. Водночас накопичується дедалі більше фактів, які свідчать, що за комплексної дії несприятливих чинників, зокрема у хронічно забруднених водоймах, системи адаптивної відповіді тварин на токсичну дію та стрес виснажуються, що призводить до спотвореної відповіді або ж її відсутності [3, 6, 10, 11, 20]. Тому доцільно з'ясувати відповідь системи специфічної детоксикації ксенобіотиків на наявність таких неспецифічних чинників, як побутові забруднювачі поокремо й у типовій забрудненій водоймі.

Специфічною молекулярною системою слугували металодепонувальні протеїни металотіонеїни (МТ), які є чутливими до токсичних металів, наявних у воді. Вони з високою ефективністю зв'язують практично весь кадмій у метаболічно-активних тканинах, беруть участь у гомеостазі цинку та міді й індукуються у відповідь на підвищення вмісту цих металів [1]. У МТ двостулкових молюсків металодепонувальна функція є визначальною, тоді як стрес-залежна активація синтезу, зумовлена широким колом чинників, у тому числі глюкокортикоїдами, цитокінами тощо, більше притаманна хребетним тваринам [22]. Проте високий вміст тіолових груп (близько 30 % цистеїну в амінокислотному складі) робить відповідь МТ як антиоксидантів на низку неспецифічних забруднювачів можливою й у молюсків [7]. Крім того, здатність МТ депонувати іони цинку визначає їхній розподіл між клітинними мішенями, а отже, впливає на редокс-статус у клітині й активність ензимів, а її порушення у молюсків призводить до розбалансування системи антиоксидантного захисту [9, 10] і стимуляції вітелогенезу [8]. Відтак, є об'єктивні передумови для дослідження відповіді МТ молюсків на вплив неспецифічних до їхньої функції чинників водного середовища.

Метою роботи було порівняти структурно-функціональні особливості МТ двостулкового молюска *Unio tumidus* із двох природних водойм після перебування тварин у лабораторному акваріумі та за впливу типових побутових забруднювачів. Для дослідження були обрані нестероїдний протизапальний засіб ібупрофен, антимікробний препарат триклозан і ксеноестроген естрон. Щорічне використання таких препаратів у економічно розвинених країнах сягає тонн. Наприклад, у Німеччині у 2001 р. було використано 345 тонн ібупрофену [18]. У Норвегії ібупрофен і його метаболіти були знайдені в усіх зразках стічних вод і морській воді в концентрації від 0,1 до 20 мкг/л, у поверхневих водах Німеччини – в концентрації 120–530 нг/л, а на водоочисних спорудах Монреалю (Канада) – 85 мкг/л [4, 18]. Триклозан вже більше сорока років використовують як антимікробний складник у милі, зубній пасті, текстильних виробках і дитячих іграшках. Він належить до десяти найчастіше виявлених органічних компонентів, які мають найвищу концентрацію у стічних водах

(більш ніж 10 мкг/л) [15]. Експертиза Центру Контролю Захворювань США довела, що більш ніж у 75 % населення віком від 5 років у сечі міститься триклозан. Естрон (E1) – природний естроген, якому належить найбільша частка серед стероїдних гормональних препаратів у стічних водах різних країн (до 70 нг/л) [12].

Двостулкові молюски є визнаними біоіндикаторними організмами, оскільки ці осілі фільтрувальні організми мають широке географічне розповсюдження, доступні для відбору і витривалі під час транспортування [22]. Тому зазначене дослідження може становити практичний інтерес у сенсі пошуку молекулярних біомаркерів забруднення водного середовища.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на дорослих особинах чоловічої статі двостулкового молюска перлівниці *Unio tumidus* із довжиною мушлі 8,0 см і масою 50-60 г. Молюсків відбирали у вересні із двох місцевостей: у верхів'ї ріки в лісовій зоні поблизу міського водозабору (умовно чиста місцевість) та у нижній течії ріки в густонаселеній місцевості, де ведеться інтенсивна аграрна діяльність, нижче міста з населенням близько 10 тис., у якому не працюють очисні споруди. Характеристики місцевостей обґрунтовано на підставі результатів власних досліджень [8, 11], а також за повідомленнями регіонального Держуправління охорони навколишнього природного середовища (<http://www.menr.gov.ua/content/article/7789>).

Молюсків адаптували до лабораторних умов протягом 7 діб. Експериментальні умови створювали у басейнах об'ємом 40 л з кількістю молюсків із розрахунку 1 особина на 4 л води згідно із загальноприйнятою схемою токсикологічного експерименту. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 7,0–8,0 мг/л, вуглекислого газу – 2,2–2,8 мг/л, рН – 7,6–8,0. Воду відстоювали і змінювали через кожні дві доби, поновлюючи в експериментальних групах вміст досліджуваної сполуки у воді. Температура води становила $18 \pm 0,5$ °С. Тварин годували подрібненим комерційним кормом Акваріус, "FITO MENU" (Україна).

Було сформовано п'ять груп молюсків. Із них чотири групи становлять особини з чистої місцевості. Це контрольна (К-) група і три групи, яким у воду додавали нестероїдний протизапальний фармацевтичний препарат ібупрофен (250 нг/л, І-група), антисептичний засіб триклозан (5-хлоро-2-(2,4-дихлорофеноксі)-фенол, 500 нг/л, Т-група) або стероїдний гормон естрон Е1 (100 нг/л, Е-група). Концентрації чинників були нижчими за межі їх розчинності у воді та відповідали діапазону їх концентрацій у поверхневих (для ібупрофену) водах або місцях скиду побутових стоків із густонаселених міст (для естрону і триклозану) [4, 12, 15, 18]. До п'ятої групи входили молюски із забрудненої стічними водами місцевості (Б-група).

Вплив досліджуваних речовин на молюсків тривав 14 діб.

Тварин умертвляли, визначали стать методом мікроскопічного аналізу гонад і відбирали у особин чоловічої статі тканину травної залози, оскільки відомо, що органічні сполуки потрапляють в організм молюсків із продуктами харчування та переважно накопичуються в кишечнику і травній залозі. Усі процедури з відбору й обробки тканини проводили на холоді. Усі реактиви, крім зазначених нижче, були від фірми "Реакім" (Україна) і мали кваліфікацію "хч".

МТ травної залози молюсків виділяли методом гель-фільтрації розчину термостабільних сполук, як описано раніше [10, 14]. Розчин термостабільних сполук одержували з 10%-го гомогенату тканини в 10 мМ *трис*-HCl буфері, рН 8,0 з додаванням

10 мМ 2-меркаптоетанолу ("Sigma") для запобігання окисненню SH-груп та інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, "Sigma"). Для запобігання втра-там металів, пов'язаних із протеїнами, в елюент не додавали ЕДТА. Вимірювали світлопоглинання проб за довжини хвилі 280 і 254 нм (D_{280} і D_{254}). МТ ідентифікували як низькомолекулярні термостабільні протеїни із високим показником співвідношен-ня світлопоглинання D_{254}/D_{280} [14] і відповідно до елюції стандартного розчину мета-лотіонеїну печінки кролика ("Sigma"). Після об'єднання проб піку МТ-вмісної фракції (10 мл) проводили визначення в ній вмісту металів та УФ-спектрів.

Вміст металодепонувальної форми МТ (МТ-Ме) у розрахунку на 1 г тканини обчислювали за модифікованим рівнянням Гамільтона, враховуючи стехіометрич-ний характер зв'язування цих металів:

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

де v – кількість металу в МТ, мкмоль/г тканини; $M(\text{MT})$ – молярна маса МТ (8600 г/ моль), 7 і 12 – кількість іонів цинку та міді (I), відповідно, які зв'язуються молекулою МТ за повного насичення [16, 19].

Загальний вміст протеїну МТ (MT-SH) у 30% гомогенаті тканини в 20 мМ трис-сахарозному буфері визначали методом А. Viarengo та співавт. [23] за взає-модією із 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою після хлороформ-етанольної екстракції МТ, та обчислювали, вважаючи, що в 1 молі МТ міститься така ж кіль-кість SH-груп, як і в 20 молях GSH.

Вміст металів (цинку, міді, кадмію) у тканині травної залози та фракціях МТ моллюсків вимірювали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті у співвідношенні 1:5 (маса:об'єм). Для визначення вмісту металу в сирій тканині використовували наважки тканини масою 250 мг. Вміст цинку та міді визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115 ("ЛОМО", Російська Федера-ція), кадмію – на спектрофотометрі S-600 з графітовим електротермічним атомі-затором ("Selmi", Україна) і виражали в мкг/г вологої маси тканини. Контроль якості визначень передбачав вимірювання концентрацій металів у кислоті, а та-кож дублікатах проб методом стандартних добавок. Нижній діапазон визначення металів становить 0,1 (1 для кадмію) мкг/г тканини. Вміст металу у складі інших, ніж МТ, компонентів обчислювали як різницю середніх значень його загального вмісту і вмісту у складі МТ.

Результати вимірювань подано у вигляді $M \pm SD$ для 8 тварин (визначення вмі-сту МТ-SH) і трьох повторів (хроматографічний аналіз МТ, вміст МТ-Ме). Якщо дані, згідно з тестом Лілієфорда, не були нормально розподілені, для їхнього статистич-ного аналізу застосовували непараметричні тести (Kruskall–Wallis ANOVA та Mann–Whitney U -test) при вірогідності за значення $p < 0,05$. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням t -тесту Стьюдента. Вірогідною вва-жали відмінність між рядами за $p < 0,05$. Відповідність між двома рядами значень встановлювали за обчисленням коефіцієнта Пірсона.

Статистичну обробку даних проводили, використовуючи пакети комп'ютерних програм Statistica v 8.0 та Exel v 10.0 для Windows 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

За допомогою гель-розподільної хроматографії в усіх досліджуваних групах мо-люсків було виявлено типовий розподіл термостабільних протеїнів (рис. 1) із наяв-

ністю фракції зі середньою молекулярною масою близько 7 кДа, ідентифікованій як МТ-вмісна фракція за ознаками термостабільності, молекулярної маси та особливостями світлопоглинання (смугою поглинання з максимумом близько 254 нм, зумовленої метал-тіолатними кластерами, яка втрачається в апоформі, та браком максимуму поглинання близько 280 нм, характерного для ароматичних амінокислот) [14]. Спектральні характеристики термостабільних протеїнів подібні в усіх групах (рис. 1, Б), за винятком групи, яка зазнавала впливу триклозану. За його впливу помітно зростає поглинання в діапазоні 260–280 нм, що може бути ознакою або збільшення частки міді у складі протеїну, або й окисних змін з утворенням дисульфідних зв'язок [24].

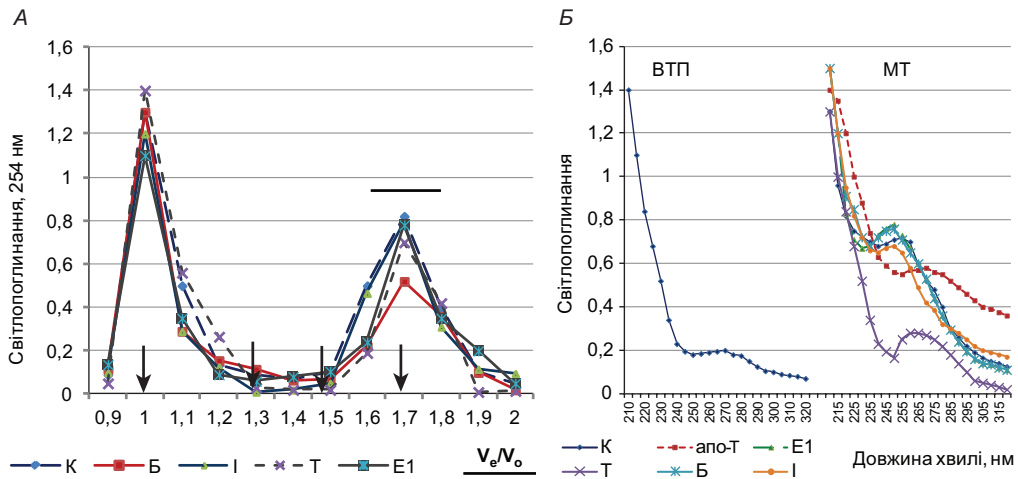


Рис. 1. Профілі елюції термостабільного екстракту травної залози молюска за хроматографії на сефадексі G-50 (А) та УФ-спектри металотіонеїн-вмісної фракції травної залози молюска (Б) у контрольних екземплярах (К) і за впливу природного забруднення (Б), ібупрофену (І), триклозану (Т) та естрону (Е1). 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, $1,7 V_e/V_o$ – 8,4 кДа, $0,96 V_e/V_o$ – 3,4 кДа. Риска відзначає об'єм елюції стандартного металотіонеїну печінки кролика. Апо-Т – УФ-спектр апотіонеїну, ВТП – високомолекулярні термостабільні протеїни

Fig. 1. The elution profiles of the thermostable extract of the mollusc's digestive gland under chromatography on Sephadex G-50 (A) and UV spectra of metalloprotein-containing fraction of the mollusc's digestive gland (B) in control specimens (K) and under the effect of natural pollution (B), ibuprofen (I), triclosan (T) and estrone (E1). The arrows indicated 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, $1.7 V_e/V_o$ – 8.4 kDa, $0.96 V_e/V_o$ – 3.4 kDa. The bar indicates the elution volume of standard metalloprotein from rabbit liver. Apo-T – UV spectra of apothioneins, ВТП – high molecular weight thermostable proteins

Визначення загальної концентрації протеїну МТ за вмістом тіолів (МТ-SH) довело (рис. 2, А), що у травній залозі двостулок із забрудненого ставу вона удвічі менша, ніж у двостулок контрольної групи. За впливу ібупрофену і триклозану концентрація МТ-SH також зменшується, а за впливу естрону – зростає порівняно з контролем. Метал-акумульовальні характеристики МТ (МТ-Ме) (рис. 2, Б) мають спільні закономірності: у двостулок із забрудненої водойми та за впливу всіх експериментальних чинників – концентрація МТ-Ме у них значно вища, ніж у контролі, особливо у Т- й Е1-групах (удвічі). При цьому лише в Е1-групі збільшення концентрації МТ-SH та МТ-Ме відбувається узгоджено (рис. 2, В).

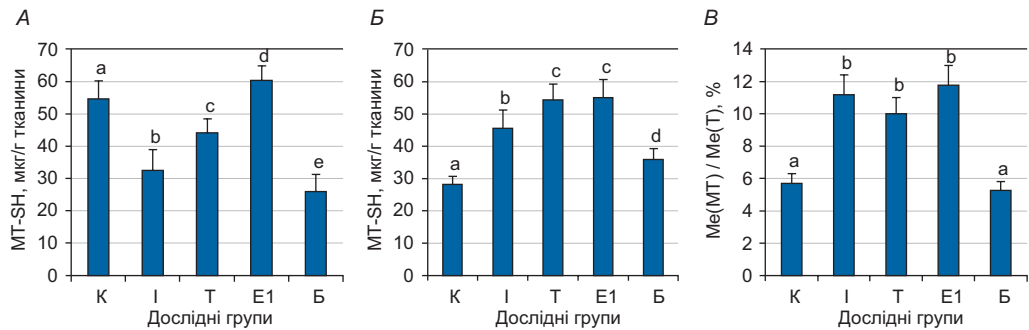


Рис. 2. Загальна концентрація металотіонеїнів (MT-SH) (А) та металовмісної форми металотіонеїнів (MT-Me) (Б) і співвідношення концентрацій металів у металотіонеїнах і тканині ((Cu+Zn+Cd)MT/(Cu+Cd+Cd) тканини) (В) травної залози молюска у контрольних екземплярів та за впливу модельних чинників, $M \pm SD$, $n = 8$. Тут і далі (рис. 3, 4) дані, позначені однією літерою, вірогідно не відрізняються, $p > 0,05$

Fig. 2. Total metallothioneins (MT-SH) (A) and metal-containing metallothioneins (MT-Me) (B) concentrations and the concentration ratio of metal in metallothioneins and in the tissue ((Cu+Zn+Cd) MT/(Cu+Cd+Cd) tissue) (B) in the digestive gland of the mollusc in the control specimens and under the effect of model factors, $M \pm SD$, $n = 8$. Here and in other figures (Fig. 3, 4): Data marked by the same letter do not differ significantly, $p > 0.05$

Співвідношення вмісту Cu:Zn:Cd для MT контрольної групи *Unio tumidus* становить 2:18:1 (див. таблицю). У молюсків із забрудненої водойми та за дії модельних чинників збільшується вміст міді та, особливо (за впливу триклозану й естрону удвічі), цинку у складі MT, а також зростає частка цинку у складі MT. Виділені MT можна кваліфікувати як Zn-MT згідно з відомим стехіометричним співвідношенням (7 атомів двовалентного металу або 12 атомів одновалентного металу на молекулу MT) [16], оскільки іони міді та кадмію трапляються лише по одному на дві-три молекули MT. Вміст кадмію у складі MT помітно зменшується за впливу ібупрофену та триклозану (на 33 %).

Кількісний склад металів у металотіонеїнах травної залози молюска за впливу природного забруднення та модельних чинників, нмоль/г тканини, $n=3$

The quantitative composition of the metals in the digestive gland metallothioneins of molluscs under the effect of natural pollution and model factors, nmol/g tissue, $n=3$

Група тварин	Cu	Zn	Cd	Співвідношення Cu:Zn:Cd
К	4,9±0,6	51,2±5,8	2,7±0,3	2:18:1
I	5,8±0,6	86,1±9,3*	1,8±0,2*	3:48:1
T	7,2±0,8*	103,1±9,8*	1,8±0,2*	4:57:1
E1	6,3±0,6*	104,2±11,2*	2,2±0,3*	3:47:1
Б	5,5±0,6	66,4±7,0*	2,7±0,3	2:12:1

Примітка: * – відмінності порівняно з показниками контрольної групи тварин вірогідні, $p < 0,05$.

Comment: * – difference comparing to the control group is significant, $p < 0.05$.

Для оцінки ефективності МТ як депо іонів металів нами було визначено загальний вміст металів у тканині травної залози (рис. 3). Із представлених результатів видно, що у двостулків із забрудненої водойми навіть після періоду депурації вміст цинку і кадмію у тканині травної залози вищий, ніж у контролі. За впливу експериментальних чинників вміст цинку та міді у тканині не зазнає змін порівняно з контролем, і лише вміст кадмію зменшується в І- та Е-групах.

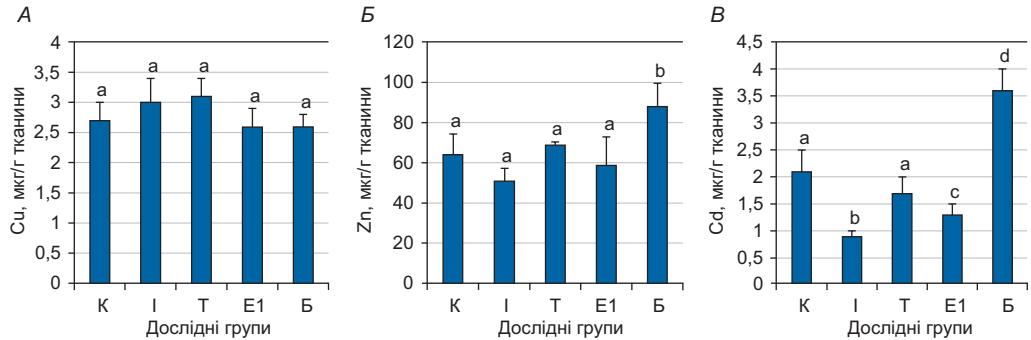


Рис. 3. Концентрація металів (Cu – А, Zn – Б, Cd – В) у тканині травної залози двостулкового моллюска *Unio tumidus* за дії експериментальних чинників і природного забруднення, $M \pm SD$, $n=8$

Fig. 3. Concentration of metals (Cu – А, Zn – Б, Cd – В) in the digestive gland tissue of bivalve mollusc *Unio tumidus* under the effect of experimental factors and natural pollution, $M \pm SD$, $n=8$

Частка акумульованих металів у МТ щодо їхнього загального вмісту в травній залозі зменшується у ряді $Cd \sim Cu > Zn$ і перебуває в межах 10–15 % для міді та кадмію і 5–10 % для цинку. Сумарна частка трьох металів становить близько 5 % від їхнього загального вмісту у тканині моллюсків, яких не піддавали впливу додаткового хімічного навантаження, та зростає до 10–12 % за впливу експериментальних чинників.

Оскільки одним із найнебезпечніших наслідків забруднення водойм побутовими стоками вважається поява ендокринних розладів у водних тварин, зокрема ксеноестрогенний ефект [13], ми визначили також вміст металів у гонадах двостулків (рис. 4). Згідно з отриманими результатами, на рівні загального вмісту металів у гонадах відмінності між двостулками з двох водойм виражені ще чіткіше, ніж за показниками травної залози. У цій тканині проявляються також відмінності і між групами, які зазнавали впливу експериментальних чинників. У цих групах вміст міді зменшується, а цинку та кадмію (у Т- й Е-групах) зростає порівняно із контролем.

Відтак, особливості складу металів МТ травної залози двостулків відображають, імовірно, спільну стратегію адаптації до впливу побутового забруднення з посиленням акумуляції цинку в цих депонувальних молекулах. Зіставлення одержаних даних з результатами визначення стану системи антиоксидантного захисту, отриманими за аналогічних умов [9], підтверджує висловлену гіпотезу, оскільки концентрація металовмісної форми МТ у тканині травної залози перебуває у негативній залежності від таких кількісних ознак токсичності як утворення оксирадикалів ($r = -0,38$, $p = 0,041$). Проте за хронічного забруднення підвищений вміст МТ-Ме поєднується з ознаками цитотоксичності й окисного пошкодження молекул [9].

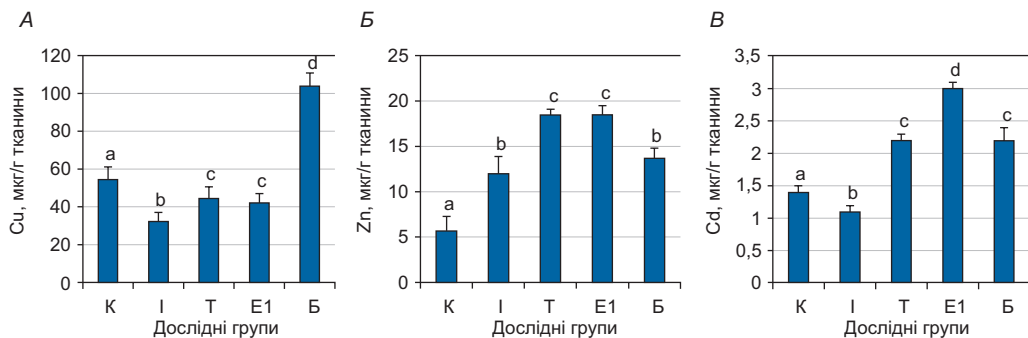


Рис. 4. Вміст металів (Cu – А, Zn – Б, Cd – В) у тканині гонад двостулкового молюска *Unio tumidus* за дії експериментальних чинників і природного забруднення, $M \pm SD$, $n=8$

Fig. 4. Content of metals (Cu – A, Zn – B, Cd – B) in the gonad tissue of bivalve mollusc *Unio tumidus* under the effect of experimental factors and natural pollution, $M \pm SD$, $n=8$

Обчислення співвідношення вмісту металів у складі МТ, а також профілі елюції термостабільних протеїнів свідчать, що зміни у функціональному стані МТ у нашому експерименті пов'язані, ймовірно, із продукцією базальної форми МТ10, яка акумулює переважно цинк [1]. Разом з тим, нами не відзначено появи мідь-МТ або кадмій-МТ, тобто посилення синтезу індукцибельних форм МТ, а зміни спектральних характеристик МТ за впливу ібупрофену не пов'язані зі зміною складу металів на користь міді у МТ.

Невідповідність між загальним вмістом протеїну МТ і їхньої металодепонувальної форми свідчить, що лише у разі дії естрогену можлива активація експресії генів, які кодують МТ. Зменшення вмісту протеїну МТ або пригнічення їхнього продукування за впливу на молюсків хронічного забруднення та поєданого впливу певних несприятливих чинників, у тому числі й підвищеної температури, описано у низці досліджень [2, 6–11]. З іншого боку, активуюча дія естрогену як ксеноестрогену на вміст МТ і, ймовірно, на експресію генів, які кодують МТ, узгоджується із інформацією про гормональний контроль синтезу МТ і залучення цинку до активації вітелогенезу [17]. Наші висновки про підвищений вміст цинку в гонадах двостулков підтверджують цей результат.

Зміна зв'язувальної здатності МТ водних тварин щодо есенціальних для них металів і зміна кількісного співвідношення металів у їх складі як реакція на хронічне побутове забруднення водою описані в літературі. Наприклад, у головня *Squalius cephalus* із місцевості у нижній течії річки кадмій-зв'язувальна здатність цитозольної фракції, представлена в основному МТ, зростає удвічі, порівняно з тваринами з верхів'я (11 нг/мл проти 5 нг/мл) на тлі стабільного вмісту МТ [21]. Також у МТ червоногого молюска трубоча, за включення в раціон устриць, які перебували протягом 14 діб у воді з підвищеним вмістом металів (кадмію та цинку поокремо і в суміші), зростає частка акумульованого цинку (у 5–7 разів), тоді як частка кадмію та вміст МТ не мають істотних відмінностей порівняно з контролем у всіх дослідних серіях [5].

Відтак, у представленому дослідженні, попри відмінні механізми впливу досліджених побутових забруднювачів на двостулкового молюска [9], аналіз характе-

ристик МТ довів наявність спільної стратегії участі цього металодепонувального протеїну в неспецифічній реакції організму на дію несприятливих чинників. Зміна металоакумулювальної здатності МТ без узгодження із загальним вмістом цього протеїну в клітинах можлива завдяки редокс-залежним особливостям його тиол-дисульфідних взаємодій [9, 25]

Отже, кількісні характеристики МТ можуть бути використані для оцінки впливу несприятливих чинників довкілля як неспецифічний маркер. Збільшення вмісту цинку у складі МТ виявилося найбільш послідовною відповіддю цих протеїнів на вплив чинників різної природи і тривалості дії.

Робота виконана за підтримки Фонду Цивільних Досліджень США (CRDF, UKB1-7109-TE-13), Міністерства освіти і науки України (НДР №125Б та М/78-2014) та Західно-Українського Фонду Біомедичних Досліджень.

1. *Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Barka S. et al.* Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, 2006; 76(2): 160–202.
2. *Bigot A., Doyen P., Vasseur P., Rodius F.* Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2009; 72(2): 382–387.
3. *Binelli A., Riva C., Provini A.* Biomarkers in Zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). **Biomarkers**, 2007; 12(4): 349–368.
4. *Blaise C., Gagne F., Eullaffroy P., Ferard J.-F.* Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Quebec, Canada): a review. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, 2006; 10(2): 29–51.
5. *Cheung M.-S., Wang W.-X.* Uses of subcellular metal distribution in prey to predict metal bioaccumulation and internal exposure in a predator. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2008; 27(5): 1160–1166.
6. *Doyen P., Bigot A., Vasseur P.* Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2008; 147 C(1): 69–77.
7. *Falfushynska H., Gnatyshyna L., Yurchak I. et al.* Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae). **Science of The Total Environment**, 2014; 500–501: 339–350.
8. *Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Farkas A. et al.* Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusc *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country. **Chemosphere**, 2010; 81(10): 1342–1351.
9. *Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Osadchuk O.Y. et al.* Diversity of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2014; 164 C: 51–58.
10. *Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Stoliar O.B.* Effect of in situ exposure history on the molecular responses of freshwater bivalve *Anodonta anatina* (Unionidae) to trace metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2013; 89: 73–83.
11. *Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Stoliar O.B.* In situ exposure history modulates the molecular responses to carbamate fungicide Tattoo in bivalve mollusc. **Ecotoxicology**, 2013; 22(3): 433–445.
12. *Fent K., Weston A.A., Caminada D.* Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, 2006; 76(2): 122–159.

13. Gagné F., Blaise C., André C. et al. Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment. **Chemosphere**, 2007; 68(4): 731–743.
14. Kagi J.H.R., Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, 1988; 27(23): 8509–8515.
15. Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, 2002; 36(6): 1202–1211.
16. Nielson K.B., Winge D.R. Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein. **Journal of Biological Chemistry**, 1984; 259(8): 4941–4946.
17. Olsson P.E., Zafarullah M., Gedamu Z. A role of metallothionein in zinc regulation after oestradiol induction of vitellogenin synthesis in rainbow trout, *Salmo gairderi*. **Biochemical Journal**, 1989; 257(2): 555–559.
18. Paíga P., Santos L.H., Amorim C.G. et al. Pilot monitoring study of ibuprofen in surface waters of north of Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, 2013; 20(4): 2410–2420.
19. 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; 126 C (2): 113–122.
20. Parvez S., Raisuddin S. Effects of paraquat on the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch): non-enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2006; 50(3): 392–397.
21. Podrug M., Raspor B., Erk M., Dragun Z. Protein and metal concentrations in two fractions of hepatic cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). **Chemosphere**, 2009; 75(7): 843–849.
22. Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2007; 146 C(3): 281–300.
23. Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. **Marine Environmental Research**, 1997; 44(1): 69–84.
24. Wilhelmsen T.W., Olsvik P.A., Hansen B.H., Andersen R.A. Evidence for oligomerization of metallothioneins in their functional state. **Journal of Chromatography A**, 2002; 979(1–2): 249–254.
25. Yang Y., Maret W., Vallee B.L. Differential fluorescence labelling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, 2001; 98: 5556–5559.

EFFECTS OF HOUSEHOLD POLLUTANTS ON THE METALLOTHIONEINS IN TISSUES OF BIVALVE MOLLUSCS *UNIO TUMIDUS*

H. Falfushynska^{1,2}, L. Gnatyshyna^{1,2}, L. Kopanytsia¹, L. Romanchuk¹, O. Stoliar¹

¹ Ternopil V. Hnatiuk National Pedagogical University, 2, M. Kryvonis St., Ternopil 46027, Ukraine
e-mail: Oksana.Stolyar@gmail.com; <http://biochemlab.tnpu.edu.ua>

² I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University, 1, Maidan Voli St., Ternopil 46001, Ukraine

Personal care products and pharmaceuticals are the most common novel water pollutants, and it is difficult to predict the effects. It is expected that they can modulate the activity of molecular detoxification systems. Since the production of the metal-binding

proteins, metallothioneins (MTs) are activated by a wide range of stress factors, the aim of the study was to compare the functional characteristics of the MTs from digestive gland (DG) of male bivalve mollusc *Unio tumidus* from reference pond, polluted by sewage effluents pond and after the exposure to widespread water personal care pollutants ibuprofen (I, 250 ng / L), triclosan (T, 500 ng / L) or estrone (E1, 100 ng / l) for 14 days (overall term of staying in the laboratory aquaria – 21 days). The elevation of the content of zinc, copper and cadmium in bivalves' tissues of DG, gonads and MTs as well as total level of MTs was noted in polluted pond compared to the reference one. Exposure factors and chronic pollution caused an increase of level of Zn-binding MT form on a background of reduced (I-, T-group) or increased (E1 group) total protein content of MTs and constant total level of zinc and copper in tissue. Under the effect of I, T and E1, marked decreasing in copper level and increasing (in 2.2–3 times) in zinc level were observed in the gonads. Thus, we should assume that the elevation of the content of zinc-MT in the bivalves DG can be considered as the compound of the unspecific supporting strategy of the signaling function of these ions under the harmful effects.

Keywords: bivalve mollusc, ibuprofen, triclosan, estron, metallothioneins, zinc.

ВЛИЯНИЕ БЫТОВЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА СОСТОЯНИЕ МЕТАЛОТИОНЕИНОВ В ТКАНЯХ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *UNIO TUMIDUS*

**Г. И. Фальфушинская^{1,2}, Л. Л. Гнатышина^{1,2},
Л. П. Копаниця¹, Л. Д. Романчук¹, О. Б. Столяр¹**

¹ Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь 46001, Украина,
e-mail: Oksana.Stolyar@gmail.com; <http://biochemlab.tnpu.edu.ua>

² Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского
ул. Майдан Воли, 1, Тернополь 46001, Украина

Средства личного пользования и фармацевтические препараты относятся к наиболее типичным и сложно прогнозируемым по эффекту современным загрязнителям водоемов. Ожидается, что они могут модулировать активность молекулярных систем детоксикации организма. Поскольку продукция металл-депонирующего протеина металлотиионеина (МТ) активируется широким диапазоном стрессорных факторов, целью исследования было сравнить функциональные характеристики МТ пищеварительной железы (ПЖ) двустворчатого моллюска *Unio tumidus* мужского пола из условно чистого водоема, водоема, загрязненного сточными водами, и при модельном действии распространенных бытовых загрязнителей водоемов ибупрофена (И, 250 нг/л), триклозана (Т, 500 нг/л) или эстрона (Э1, 100 нг/л) в течение 14 суток (общий срок пребывания в лабораторных условиях – 21 сутки). Отмечено повышенное содержание цинка, меди и кадмия в тканях ПЖ и гонад, а также в составе МТ, и уменьшение общего содержания МТ в ткани ПЖ двустворчатых из загрязненного водоема по сравнению с контролем. Экспериментальные факторы, как и хроническое загрязнение, вызывают увеличение содержания цинк-депонирующей формы МТ, которое происходит на фоне уменьшения (И-, Т-группы) или увеличения (Э1-группа) общего содержания протеина МТ и неизменного

общего содержания цинка и меди в ткани. В гонадах при воздействии И, Т и Э1 отмечено уменьшение содержания меди и увеличение (в 2,2–3 раза) содержания цинка. Следовательно, увеличение содержания цинк-МТ в ПЖ двустворчатых можно рассматривать как составляющую неспецифической стратегии обеспечения сигнальной функции этих ионов в условиях влияния повреждающих факторов.

Ключевые слова: двустворчатый моллюск, ибупрофен, триклозан, эстрон, металлотioneины, цинк.

Одержано: 05.12.2014