

УДК 577.352.38:577.64

**Галина ФАЛЬФУШИНСЬКА, Леся ГНАТИШИНА, Тетяна ШИМКІВ,
Оксана СТОЛЯР**

**РЕАКЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ТА
ЕФЕКТИВНІСТЬ ЇХ МЕТАЛ-ДЕПОНУЮЧОЇ ТА
АНТИОКСИДАНТНОЇ ФУНКЦІЙ У АДАПТАЦІЇ РИБИ
CARASSIUS CARASSIUS ДО ПРИРОДНОГО ЗАБРУДНЕННЯ**

*Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка,
вул. М. Кривоноса, 2, 46027 Тернопіль, Україна
e-mail: halynka.f@gmail.com, oksana.stolyar@gmail.com*

*Металотіонеїни (МТ) є стресорними білками з метал-депонуючою та антиоксидантною функціями, співвідношення між якими у тварин в природних умовах існування не з'ясоване. Для визначення ефективності цих функцій у риб за умов комплексного забруднення середовища визначали хроматографічну поведінку та концентрацію МТ за вмістом металів (Me-МТ) та тіолів (SH-МТ) в печінці та зябрах карася (*Carassius carassius*) з двох місцевостей весною, влітку та восени. Вимірювали також концентрацію глутатіону (GSH), супероксид-аніону ($O_2^{\cdot -}$) та карбонільних похідних білків (КПБ). Згідно факторного і кореляційного аналізів сезонна залежність показників риб домінувала в печінці, а просторова була більше виражена у зябрах. Восени спостерігали збільшення об'єму ізоформи МТ-2/2а та частки міді у складі металів МТ. При порівнянні реакційної здатності SH-груп реконструйованих α - та β -доменів МТ карася встановлено, що вона вища у Cu - β -домену. Тому високий вміст тіолів SH-МТ та GSH у поєднанні з малими значеннями вмісту $O_2^{\cdot -}$, КПБ та Me-МТ у карася із забрудненої водойми восени, особливо в зябрах, трактуємо як свідчення ослаблення метал-депонуючої здатності МТ на користь антиоксидантної функції Cu -МТ. Мікроядерний тест підтвердив відсутність токсичного ефекту на риб у забрудненій місцевості.*

*Ключові слова: *Carassius carassius*, металотіонеїни, антиоксидантний захист, природне забруднення.*

Карась вирізняється з-поміж прісноводних риб винятковою витривалістю до умов існування. Він володіє унікальними морфологічними пристосуваннями в зябрах та здатністю до активації анаеробного гліколізу з перетворенням лактату на етанол і вуглекислоту, які виводяться через зябра, забезпечуючи адаптацію до умов гіпоксії [3, 14, 18]. Разом з тим, молекулярні стрес-лімітуючі процеси в тканинах карася досліджені лише за умов модельного впливу окремих токсикантів та у печінці [3, 23].

Білки металотіонеїни (МТ) реалізують свої біологічні функції, які полягають у депонуванні іонів важких металів та антиоксидантному захисті, головним чином у стресорних ситуаціях, завдяки посиленій експресії під впливом численних індукторів [19, 24]. Тому являло інтерес дослідити їх участь в адаптаціях карася до несприятливих умов існування. Для характеристики впливу пошкоджуючих чинників на МТ, як правило, визначають концентрацію білка МТ за вмістом тіолів (SH-МТ) та/або рівень експресії його м-РНК у тканинах [24]. Однак дослідження свідчать, що при такому спрощеному підході поза увагою залишаються важливі деталі, які би могли прояснити механізми адаптації МТ [6, 8, 15, 19]. Тому метою нашого дослідження стало з'ясувати межі мінливості фізико-хімічних властивостей МТ карася залежно від умов природного існування та у порівнянні з характеристиками метал-депонуючої функції цих білків та антиоксидантного захисту у тканинах печінки і зябер карася.

Матеріали та методи

Дослідження проводились у травні, липні та вересні на дворічках карася (*Carassius carassius*, Cyprinidae). Екземпляри тварин довжиною 15-20 см та середньою масою тіла 150-180 г відбирали із двох місцевостей: рибогосподарські ставки в урочище Залізці у верхів'ї ріки Серет (умовно чиста місцевість, 3-група) та став у нижній течії ріки Нічлава, нижче м. Борщів (місцевість з високою аграрною активністю та відсутністю водоочисних споруд, Б-група, високий рівень комплексного забруднення у який підтверджено нашими дослідженнями хімічного складу води, біомаркерів моллюсків [7] та інформацією [8]). Екземпляри доставляли в лабораторію в аерованій воді із місця відбору, де досліджували не більше як через 12 год. Експерименти на тваринах проводились у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). В експерименті було використано 48 тварин. Для дослідження використовували печінку і зябра карася. Всі процедури з відбору й обробки тканин проводили на холоді. Всі реактиви, крім зазначених, були фірми "Реахим" кваліфікації х.ч.

МТ виділяли хроматографічно із термостабільного екстракту тканин карася [6, 8]. У середовище виділення додавали 10 мМ 2-меркаптоетанол ("Sigma") для запобігання окиснення SH-груп та інгібітор протеаз фенілметилсульфонілфторид (0,1 мМ, "Sigma"). Для визначення молекулярної маси МТ та виділення їх окремих доменів здійснювали їх гель-розподільчу хроматографію на сефадексі G-50 за умов описаних в [8]. Для характеристики ізоформного складу та метал-депонуючої функції МТ проводили хроматографію термостабільного екстракту на ДЕАЕ-целюлозі [6, 8]. МТ ідентифікували як фракцію термостабільних білків з максимальним співвідношенням D_{254}/D_{280} [12]. Вимірювали УФ-спектри та вміст металів у об'єднаному елюаті окремих форм МТ (в об'ємі 15 мл). Вміст міді та цинку в МТ визначали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса:об'єм) на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115 (Ломо), кадмію – на графітовому спектрофотометрі S-600 (Селмі) і виражали в нмоль на г сирої маси тканини.

Окремі домени МТ виділяли після часткового насичення білку іонами кадмію (α -домен) або міді (I) (β -домен) та обмеженого гідролізу субтилізином [17, 27]. Для виділення Cd₄- α домену згідно [27] шойно одержану шляхом гель-хроматографії

на сефадексі G-50 МТ-вмісну фракцію обробляли 2,25 М CdCl_2 у присутності 1 мМ ЕДТА в 10 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,8 при 25°C протягом 1,5 год. Одержаний білок інкубували з субтилізином ("Sigma") у співвідношенні 20:1 (білок:протеаза) при 37°C в 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0 протягом 16 год. Cu_6 - β домен отримували з апотіонеїну [17], виділеного елюцією МТ-вмісної фракції на сефадексі G-25 (колонка розміром 1,5×25 см) 0,05 М розчином НСІ. Фракцію, що містила апотіонеїн, інкубували з свіжовиготовленим 0,6 % розчином CuCl в 0,1 М деаерованій НСІ, яка містила 4% NaCl . Тоді в пробу додавали субтилізін у співвідношенні 20:1 (білок:протеаза) та інкубували протягом 16 год. Відокремлення доменів від інших продуктів реакції проводили на сефадексі G-50 з використанням 10 мМ трис-НСІ буферу, рН 8,0 і колонки розміром 50×1,5 см з охолоджуючим кожухом. Реєстрували УФ-спектри отриманих фракцій.

Реактивність SH-груп визначали у реакції із реактивом Елмана (дитіонітробензойна кислота, ДТНБ, "Sigma") в концентрації від 0,25 до 6,0 мМ, за умов надлишку ДТНБ в реакційній суміші [13]. Вміст апотіонеїну та доменів визначали при 220 нм за молярними коефіцієнтами для апотіонеїну $48000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (при рН 2) та 78900 та $69100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для α - та β - доменів відповідно [11].

Обчислювали вміст МТ в тканині за вмістом цинку і міді у їх складі (Me-МТ), враховуючи стехіометрію зв'язування [20] та за вмістом тіолових груп (SH-МТ) [25]. Загальну концентрацію глутатіону (GSH) визначали ферментним методом за допомогою ДТНБ після відновлення дисульфідних груп глутатіонредуктазою в присутності НАДФН ("Sigma") [2]. Вміст карбонільних похідних білків (КПБ) визначали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [21], утворення супероксид аніон-радикалу ($\text{O}_2^{\cdot-}$) у розчинній фазі гомогенату – за ступенем відновлення цитохрому с [10].

Генотоксичність середовища для карася характеризували за дефектами ядра в еритроцитах, які спостерігали після забарвлення препаратів 5% розчином Гімзи під мікроскопом під олійною імерсією, ×1000 (мікроядерний тест) і виражали в розрахунку на 1000 клітин (%) [4]. Загальна кількість проаналізованих клітин на цитологічному препараті складала не менше 2000 клітин в кожному випадку.

Результати вимірів подані у вигляді $M \pm SD$ для восьми тварин дослідної групи, або для трьох вимірів для хроматографічної фракції. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням t-тесту Стьюдента. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали, використовуючи комп'ютерні програми Statistica v 7.0 та Exel для Windows-2000.

Результати та обговорення

Термостабільні білки тканин карася при хроматографії на сефадексі G-50 утворюють дві фракції (рис. 1А), остання з яких нами була ідентифікована як МТ-вмісна за термостабільністю, низькою молекулярною масою (7-8 кДа) та високим співвідношенням спектральних показників D_{254}/D_{280} (2,4 проти 1,1 у високомолекулярної фракції), яке вказує на наявність метал-тіолатних кластерів та відсутність ароматичних амінокислотних залишків у складі білку [12]. Реконструкція гомометалічних доменів МТ показала, що як $\text{Cd-}\alpha$, так і $\text{Cu-}\beta$ домени утворюють форми з M близько 4 кДа, крім яких елюються також форми з M близько 16 кДа. В ультрафіолетових (УФ) спектрах МТ та $\text{Cd-}\alpha$ домену максимум поглинання відповідає 254 нм, $\text{Cu-}\beta$ -домени – зміщений до 260 нм, що узгоджується із специфікою складу метал-тіолатних комплексів [16], а у форм з M 16 кДа максимум має вигляд

розмитого плеча, що може бути зумовлено олігомеризацією пептидів, нелігованих металом [27]. У реакції з ДТНБ, яка відбувається за умов псевдопершого порядку ($[ДТНБ] \gg [MT]$) формам, виділеним за насичення іонами міді властива значно вища реактивність SH-груп, ніж кадмій-зв'язуючим формам (рис. 1в). При цьому кінетика реакції α - та β - доменів МТ наближається до лінійної, тоді як для олігомерів вона є двофазною.

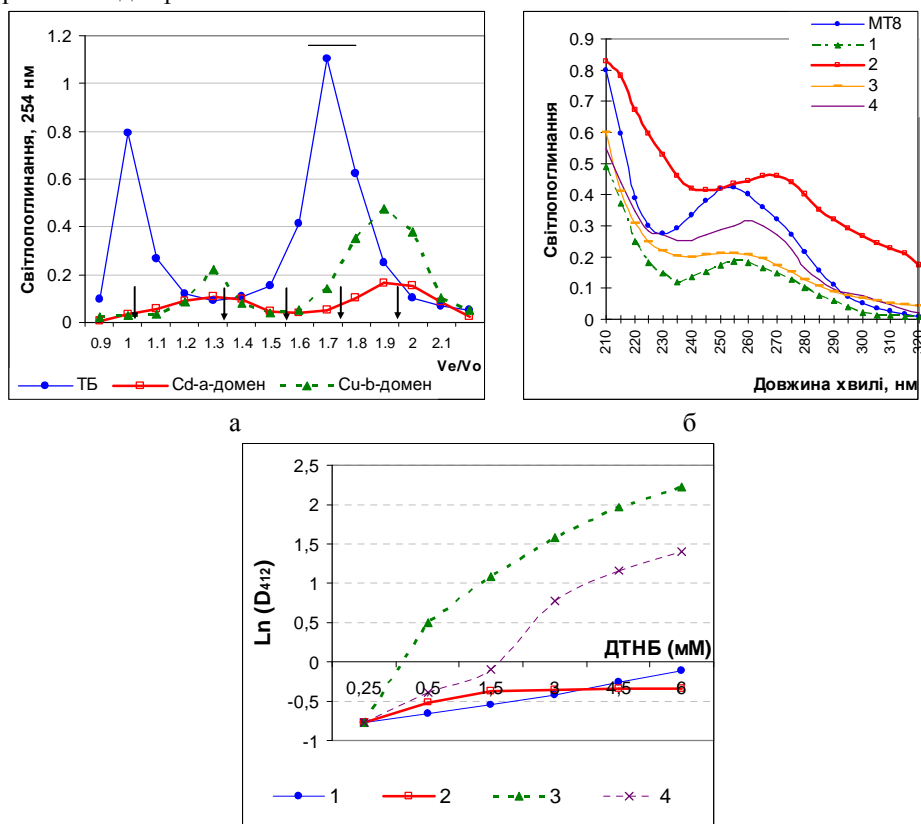


Рис. 1. Профілі елюції термостабільних білків печінки та окремих доменів металотіонеїнів карася на Сефадексі G-50 (А), УФ-спектри цих білків (Б) та криві титрування їх тіолових груп ДТНБ (В). 1 – Cd- α -домен, 2 – Cd-16 кДа форма, 3 – Cu- β -домен, 4 – Cu-16 кДа форма. Горизонтальною лінією виділена металотіонеїн-вмісна фракція, стрілками показано 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.

При іонообмінній хроматографії МТ карася утворюють дві ізоформи (рис. 2), ідентифіковані як МТ-1 та МТ-2 згідно профілю елюції стандартного МТІ кролика. Головна форма, МТ-1, елюється при 0,24 М NaCl, а МТ-2/2а весною і влітку виражена слабо і має параметри елюції 0,39 М NaCl (МТ-2, виявлена переважно в 3-групі риб) або 0,32 М NaCl (МТ-2а, виявлена переважно у риб Б-групи). Така мінливість виходу форм МТ-2/2а є типовим проявом мікрогетерогенності ізоформ

тваринних МТ [26]. Восени вихід МТ-2/2а форм різко збільшується, особливо в зябрах.

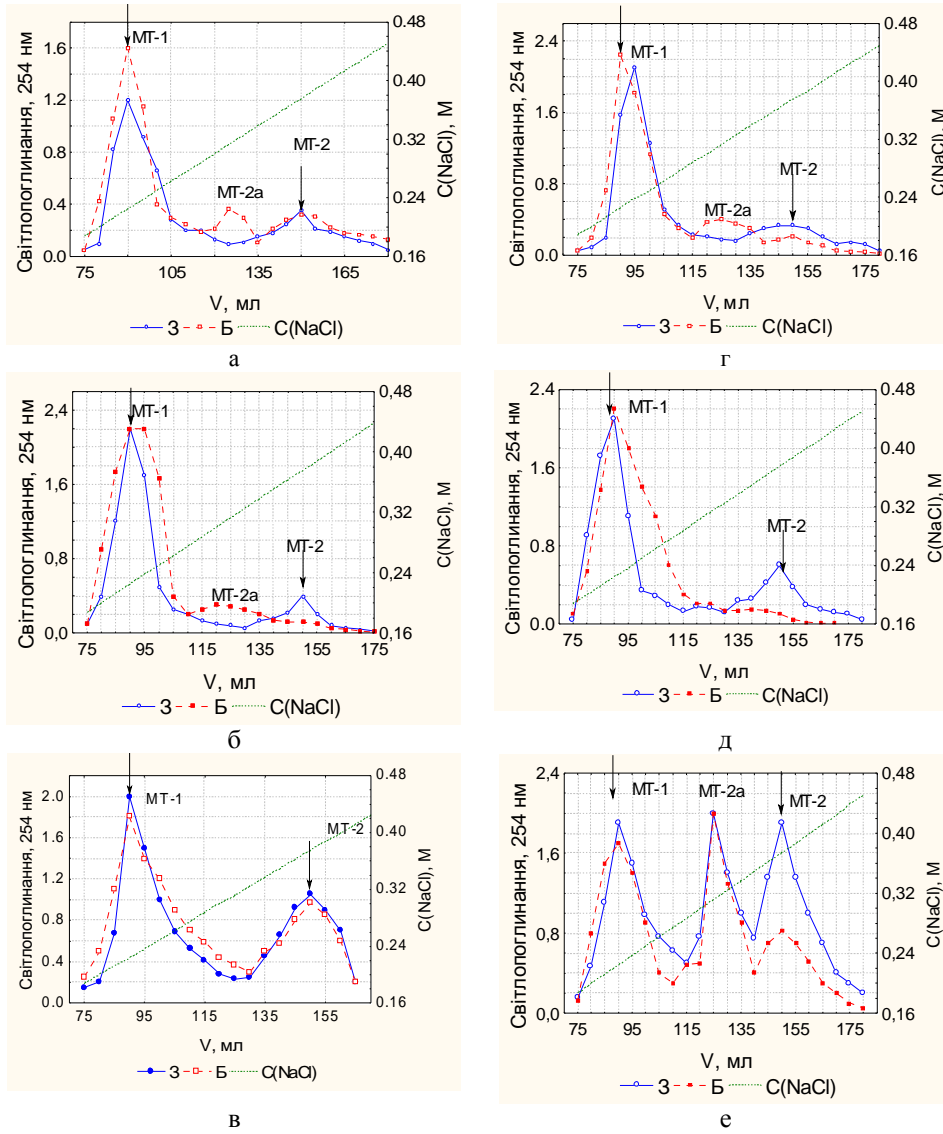


Рис. 2. Профілі елюції одержані при іонообмінній хроматографії термостабільного екстракту печінки (а-в) та зябер (г-е) карася з природних водойм весною (а, г), влітку (б, д) та восени (в, е) на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl (0–1 М) в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 8,0. Стрілками позначено вихід фракцій МТ-1 і МТ-2 стандартного металотіонеїну МТІІ печінки кролика.

Вміст металів у складі МТ коливався в межах 7–25 нмоль/г тканини для міді, 80–120 нмоль/г тканини для цинку та 1–12 нмоль/г тканини для кадмію. Особливо суттєві відмінності за вмістом окремих металів та загальним вмістом Me-МТ між двома групами були відзначені у зябрах із протилежним спрямуванням весною та восени (рис. 3, табл.). Динаміка співвідношення вмісту металів в окремих формах МТ проявлялась як зростання частки міді по відношенню до цинку від весни до осені, особливо в МТ–2/2а та у карасів Б-групи.

Таблиця

Вміст металотіонейнів карася із природних водойм обрахований за кількістю зв'язаних з ними металів (Me-МТ), мкг/г тканини, M \pm SD, n = 8

Група тварин	Весна	Літо	Осінь
Печінка			
З	69,9 \pm 6,4	64,4 \pm 5,9	51,3 \pm 4,8 ^a
Б	71,3 \pm 6,9	74,0 \pm 0,8 ^b	48,2 \pm 4,1 ^a
Зябра			
З	47,0 \pm 3,9	54,3 \pm 4,6	71,0 \pm 7,2 ^a
Б	71,2 \pm 7,4 ^b	47,0 \pm 4,1 ^a	36,4 \pm 2,9 ^{a,b}

a – сезонні зміни порівняно з весною,

b – просторові зміни між місцевостями вилову достовірні, p < 0,05.

Визначення характеристик стану системи антиоксидантного захисту (рис. 4) свідчить про спільну сезонну динаміку для тканинних тіолів у тканинах та O₂^{•-} із максимумом влітку (r>0,73, p<0,001 для SH-МТ та O₂^{•-} за даними для обох тканинах та r=0,51, p<0,01 для GSH та O₂^{•-}, у печінці), O₂^{•-} та КПБ у зябрах ((r=0,70, p<0,001), а також для КПБ та Me-МТ у печінці із максимумом весною (r=0,78, p<0,001). При цьому спостерігаються відмінності між групами, які мають протилежні спрямованості у окремі сезони. Так, вищий рівень утворення O₂^{•-}, як і більша концентрація КПБ весною спостерігаються в Б-групі, а влітку і восени – в З-групі із тканинними особливостями. Найбільш послідовно відмінності між групами виражені восени, коли в тканинах риб Б-групи виявлено вищий вміст GSH та SH-МТ та нижчий вміст КПБ та O₂^{•-}, ніж у риб З-групи. Інтегральний індекс антиоксидантно-прооксидантного стану [1], обчислений за вмістом обох тіолів та КПБ, свідчить, що восени в тканинах карасів Б-групи значно вищий антиоксидантний потенціал, ніж в З-групі, особливо в зябрах (рис. 5).

Оцінка генотоксичності середовища для карася (рис. 6) показала, що в обох групах трапляються еритроцити з мікроядрами в межах від 1,0 \pm 0,2 ‰ до 4,0 \pm 2,0 ‰ та іншими аномаліями ядер в межах 6 \pm 3 ‰ – 10 \pm 4 ‰, проте статистично вірогідні відмінності між групами не виявлені (p>0,05). Як свідчать результати двоваріантного дисперсійного аналізу ANOVA для всіх визначуваних показників карася, залежність від сезону виражена більше, ніж просторова (p<0,05). Разом з тим, факторний аналіз (рис. 7) дозволив встановити, що спільні для двох груп сезонні закономірності чітко виражені у печінці, тоді як за показниками у зябрах групи розташовані незалежно від сезону.

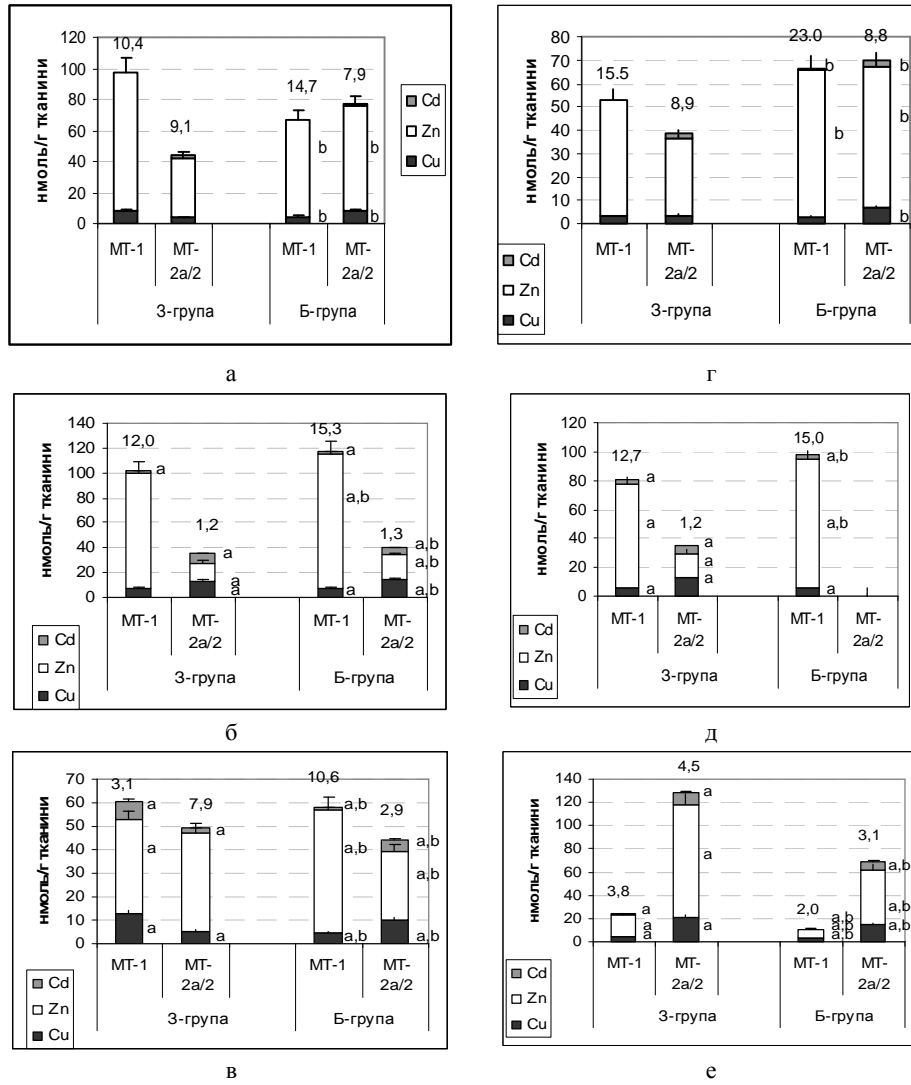


Рис. 3. Розподіл міді, цинку та кадмію між ізоформами металотіонейнів печінки (А-В) та зябер (Г-Е) карася з природних водойм весною (А, Г), влітку (Б, Д) та восени (В, Е). Примітка. Тут і на рис. 4 – а – сезонні зміни порівняно з весною, б – просторові зміни між місцевостями вилову достовірні, $p < 0,05$.

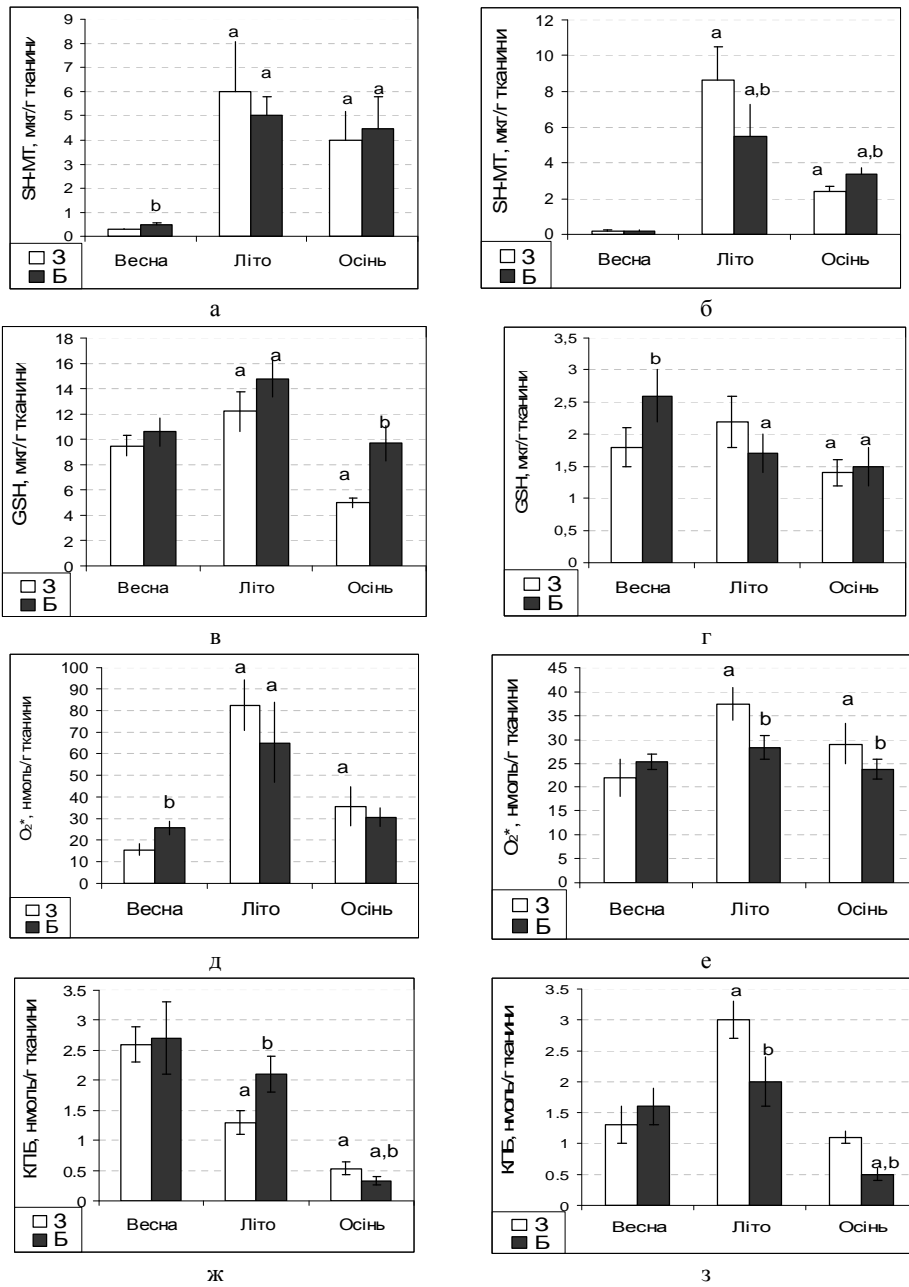


Рис. 4. Біохімічні показники печінки (А, В, Д) та зябер (Б, Г, Е) карася з природних водойм весною (А, Г), літку (Б, Д) та восени (В, Е): А,Б – вміст металотіонеїнів, В, Г – вміст загального глутатону, Д, Е - утворення супероксиданіону (O₂^{*}), Ж, З - карбонільні похідні білків (КПБ).

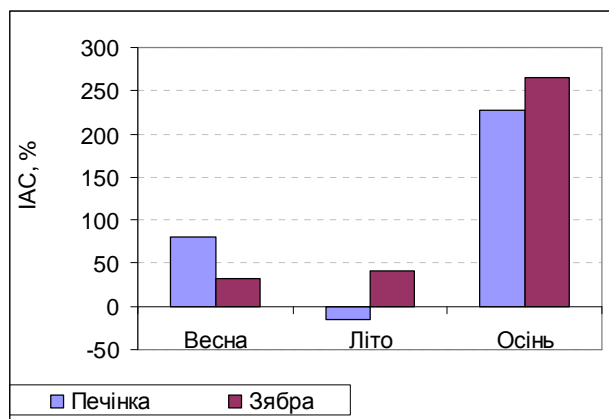


Рис. 5. Інтегральний індекс антиоксидантно-прооксидантного стану (ІАС) тканин карася Б-групи порівняно із 3-групою.

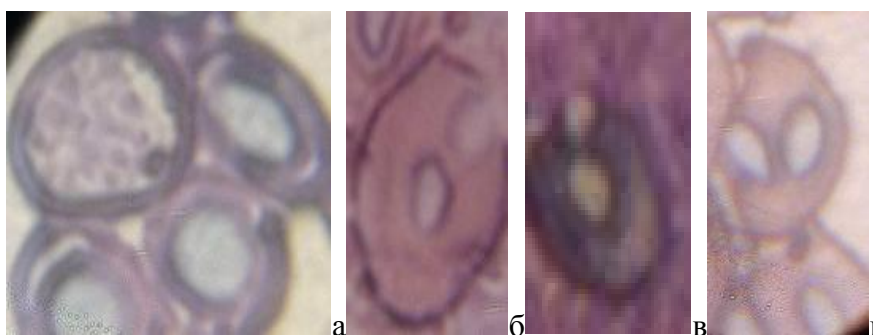


Рис. 6. Мікроядра (А-В) та двоядерні клітини (Г) в еритроцитах периферійної крові риб *Carassius carassius*, забарвлення 5% Гімза, x1000.

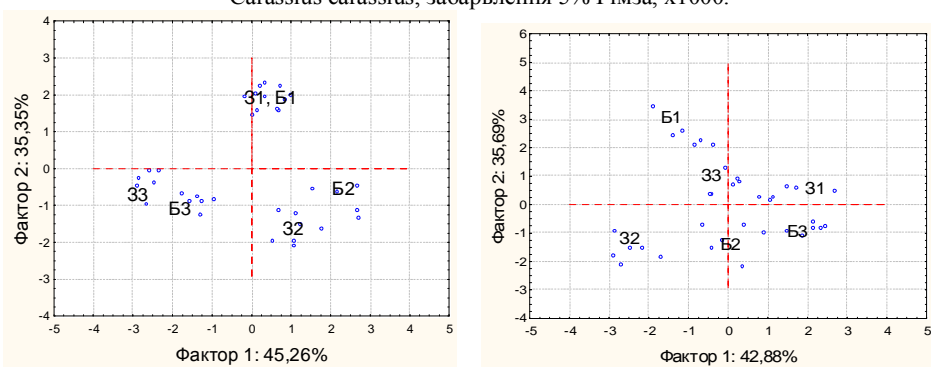


Рис. 7. Результати факторного (центроїдного групового) аналізу біохімічних показників і металозв'язуючої здатності металотіонеїнів печінки (А) та зябер (Б) карася із 3- та Б-групи весною – 1, влітку – 2 та восени – 3.

У природному середовищі хронічна дія токсикантів у поєднанні із зміною в температурних та кисневих режимів викликає різноманітні відповіді з боку стрес-лімітуючих систем організму, які, за умов адекватної відповіді, повинні забезпечувати регуляцію за принципом зворотного зв'язку [9, 14]. В нашому дослідженні за характеристикою генотоксичності та домінуванням сезонних залежностей над просторовими для показників карася можна твердити про адекватність біологічної відповіді, не зважаючи на те, що ми маємо свідчення забруднення місцевості Б як за хімічними показниками, так і за ознаками ураження системи антиоксидантного захисту, гормонального дисбалансу, активації мікросомального окиснення у молюсків [7]. Разом з тим, відмінності між двома карася восени мали послідовний характер і чітко вказували на більшу ефективність системи антиоксидантного захисту та низьку метал-депонуючу здатність МТ у карася в Б групі, особливо у зябрах.

Відомо, що МТ хребетних тварин складаються з двох глобулярних доменів, з'єднаних між собою гнучким Lys-Lys містком [12, 22]. N-термінальний сегмент (β -домен) зв'язує три іони цинку (II) або шість іонів міді (I), скоординованих із дев'ятьма залишками цистеїну, а C-термінальний сегмент (α -домен) - чотири іони цинку (II), зв'язаних із 11 залишками цистеїну. Мідь проявляє вищу спорідненість до β -домену, а цинк та кадмій – до α -домену [17, 27], на чому і ґрунтується виділення окремих доменів МТ за умов неповного насичення білку металом та ферментного гідролізу нестабілізованої металом ділянки молекули [5, 27]. Особливості просторової організації мідь-тіолатних зв'язків β -домену в МТ карася сприяють більшій реактивності SH-груп, координованих іонами металу [22]. Аналогічні закономірності спостерігаються і у ссавців, наприклад за окисної дії оксиду азоту NO [28]. Висока реакційна здатність тіолів в β -домені МТ може бути пояснена відносно низьким вмістом лізину, що утворює водневі зв'язки з SH-групами, а отже вищою доступністю нелігованих сульфгідрильних груп [11].

Восени у карася зросла частка міді у складі МТ, чому відповідало і збільшення їх гетерогенності, яке є ознакою Cu-МТ [6]. Зваживши на високу реакційну здатність тіолів в Cu-МТ карася, можна пояснити ефективний антиоксидантний захист тканин карася Б-групи в цей період участю тіолів у його забезпеченні. Разом з тим, залучення МТ до антиоксидантного захисту відбувається одночасно із послаблення метал-депонуючої функції, тобто сприяє вивільненню іонів цинку, які можуть здійснювати регуляторну роль у клітині, зокрема на рівні експресії стресорних білків [12]. Наведенні міркування узгоджуються із відомостями про мобільність металів у термодинамічно нестійких металтіолатних кластерах МТ [11]. У коропа в аналогічних умовах ми також спостерігали певні ознаки активації детоксикаційних систем, виражені, як і у карася, у збільшенні вмісту SH-МТ та GSH [8]. Проте лише у карася ці риси поєднувались із зменшенням вмісту продуктів окисної деструкції та активних форм кисню у тканині зябер, тобто були найбільш ефективними.

Висновки

Карась добре адаптується до умов природного забруднення, оскільки спільні сезонні закономірності переважають у нього над просторовими особливостями. Зростання частки міді у складі металотіонеїнів у осінній період сприяє ефективності антиоксидантного захисту в тканинах, особливо зябрах, карася за існування у

забрудненому середовищі. Отже, результати дослідження демонструють високий адаптаційний потенціал молекулярних антистресорних систем карася, пов'язаний з високою реакційною здатністю їх мідь-МТ.

Робота виконана за підтримки МОН України в межах Спільного Українсько-Корейського науково-технічного проекту № М/256-2008, Українсько-Індійської НДР № М/567-2009 та Західно-Українського Біомедичного Центру.

ЛІТЕРАТУРА

1. Деклараційний патент на корисну модель № 45298 (UA), МПК (2009): А61К 38/04; В63С 9/00; С12N 9/00; G01N 33/00. Спосіб інтегральної оцінки біологічної відповіді на стан водного середовища / *Столяр О.Б., Фальфушинська Г.І., Міщук О.В. (Україна)*. Заявл. 13.02.2009; Опубл. 10.11.2009, Бюл. № 21.
2. *Anderson M.E.* Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples // *Meth. Enzymol.* – 1985. – Vol. 113. – P. 548-555.
3. *Bagnyukova T.V., Chahrak O.I., Lushchak V.I.* Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress // *Aquat. Toxicol.* - 2006. – Vol. 78. – P. 325-331.
4. *Barsiene J., Andreikenaite L., Rybakovas A.* Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil // *Ekologija.* - 2006. – Vol. 1. – P. 25-31.
5. *Cols N., Romero-Isart N., Bofill R. et al.* In vivo copper- and cadmium-binding ability of mammalian metallothionein β domain // *Protein Engineering.* – 1999. - Vol. 12, N 3. – P. 265-269.
6. *Falfushynska H., Romanchuk L., Stolyar O.* Seasonal and spatial comparison of metallothioneins of frog *Rana ridibunda* in feral populations // *Ecotoxicology.* – 2008. – Vol. 17, N 8. – P. 781-788.
7. *Falfushynska H.I., Delahaut L., Stolyar O.B. et al.* Multi-biomarkers approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister basin (Ukraine) // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* - 2009. – Vol. 57. – P. 86-95.
8. *Falfushynska H.I., Stolyar O.B.* Function of metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2009. - Vol. 72. - P. 1425-1432.
9. *Galindo T.P., Moreira L.M.* Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) // *Genet. Mol. Biol.* – 2009. – Vol.32, N2. – P. 394-398.
10. *Hassoun EA., Ray S.* The induction of oxidative stress and cellular death by the drinking water disinfection by-products, dichloroacetate and trichloroacetate in J774.A1 cells // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2003. – Vol. 135C, №2. – P. 119-128.
11. *Jiang L.-J., Vasak M., Vallee B.L., Maret W.* Zinc transfer potentials of the a- and b-clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule // *PNAS.* – 2000. - Vol. 97, N 6. – P. 2503-2508.
12. *Kagi J.H.R., Schaffner A.* Biochemistry of metallothionein // *Biochemistry.* - 1988. - Vol. 27. - P. 8509-8515.
13. *Kim B.S., Kwon H.J., Choi M.U., Koh E.H.* Molecular Characteristics of CysteinyI Groups of Metallothionein by 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) // *Korean Biochem. J.* - 1987. - Vol. 20. - P. 223-229.

14. *Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A., Hermes-Lima M.* Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation // *Am. J. Physiol.* – 2001. – Vol. 280. – P. R100-R107.
15. *Lygren B., Hamre K. Waagbø R.* Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed three different levels of dietary vitamin E // *Aquac. Res.* – 2000. – Vol. 31. – P. 401-407.
16. *Münster K., Germann U.A., Beltramini M. et al.* (Cu,Zn)-Metallothioneins from Fetal Bovine Liver. Chemical and spectroscopic properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260, N 18. – P. 10032–10038.
17. *Nielson K.B., Winge D.R.* Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259. – P. 4941-4946.
18. *Nilsson G.E., Renshaw G.M.C.* Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark // *J. Exp. Biol.* - 2004. – Vol. 207. – P. 3131-3139.
19. *Olsvik P.A., Kristensen T., Waagbø R. et al.* Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* – 2006. - Vol. 209. – P. 2893-2901.
20. *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 // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2000. – Vol. 126C. – P. 113-122.
21. *Reznick A.Z., Packer L.* Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay // *Meth. Enzymol.* - 1994. – Vol. 233. – P. 357-363.
22. *Romero-Isart N., Oliva B., Vašák M.* Influence of NH - S γ bonding interactions on the structure and dynamics of metallothioneins // *J. Mol. Modeling.* – 2009. - In press, DOI 10.1007/s00894-009-0542-x.
23. *Shi H., Sui Y., Wang X. et al.* Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus* // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2005. – Vol. 140C, N 1. – P. 115-121.
24. *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 // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2007. – Vol. 146C. – P. 281-300.
25. *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 // *Mar. Environ. Res.* – 1997. – Vol. 44. – P. 69–84.
26. *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.
27. *Winge D.R., Miklossy K.A.* Domain nature of metallothionein // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257. – P.3471-3476.
28. *Zangger K., Oz G., Haslinger E. et al.* Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15, N7. – P. 1303-1305.

SUMMARY

Halyna FALFUSHYNSKA, Lesia GNATYSHYNA, Tetyana SHYMKIV, Oksana STOLIAR

REACTIVITY OF METALLOTHIONEINS AND THE EFFICIENCY OF THEIR METAL-KEEPING AND ANTIOXIDATIVE FUNCTIONS IN THE ADAPTATION OF FISH *CARASSIUS CARASSIUS* TO FIELD POLLUTION

*Ternopil National Pedagogical University,
Kryvonosa Str 2, 46027 Ternopil, Ukraine
e-mail: halynka.f@gmail.com, oksana.stolyar@gmail.com*

Crucian carp *Carassius carassius* is a hardy fish, which is widely distributed in fresh waters and whose feeding habits expose it to many different types of environmental contaminants. It is known to be especially well equipped for metabolic depression, and the gills play an important role in this tolerance. It is the only adult vertebrate known to have this ability. However, the molecular stress-related processes in the tissues of crucian carp are studied scant and mainly under the effect of separate toxic substances in the laboratorial studies. Metallothioneins (MTs) are stress-proteins with metal-keeping and antioxidant functions, which parity in animals from field conditions is unclear. Since the synthesis of MTs is often induced when organisms are exposed to heavy metals, especially Cd, MTs are proposed to be a specific “biomarker” responsive to metal pollution in aquatic animals, including fish.

The aim of this study was to appreciate the variability of responses of MTs in the crucian carp from mixed polluted environment. For that, the chromatographic behaviour and MTs concentration were determined as their metal (Me-MT) and thiol (SH-MT) contents in the liver and gills of fish from two sites in spring, summer and autumn. Sites near the springs of the river (comparatively clean) and downstream of the river (polluted) were selected. To elucidate the contribution of the temporal and spatial factors in the variability of the responses of antioxidative defence system, the glutathione (GSH), superoxide-anion ($O_2^{\bullet -}$) and protein carbonyls (PC) concentrations were determined. The

Gel-filtration of the thermostable solutions from both liver and gills of crucian carp on Sephadex G-75 revealed peak identified as MT-containing peak based upon its spectral features, thermostability, and low molecular weight, apparently of 7 – 8 kDa. The anion-exchange liquid chromatography on DEAE cellulose of the thermostable solution demonstrated two chromatographic forms, constant MT-1 (0,24 M NaCl) and variable MT-2/2a (0,39 M NaCl/0,32 M NaCl). The content of metals in the composition of MTs ranged at 7 – 25 nmol/g of tissue for the copper, 80 – 120 nmol/g of tissue for the zinc, and 1 – 12 nmol/g of tissue for the cadmium. Especially significant differences of the content of separate metals and general content of Me-MT between the two groups were shown in the gills. These differences were opposite in spring and autumn. The elevation of the value of MT-2/2a form in autumn and the increase of the part of the copper compare to the zinc in the metal composition of MTs from spring to autumn was detected. It was particularly prominent in MT-2/2a and in the fish from polluted site.

The separate domains of the MTs of crucian carp were isolated. Incubation of Cd-enriched MTs with EDTA and subtilisin produced α -domain, whilst the preferential binding of Cu(I) to the β domain of the apothionein and the tolerance toward proteolysis of the Cu(I) bound domain permit the isolation of β -domain. In order to characterize the reactivity of the cysteinyl groups in separate domains, we studied their reactions with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent). By the comparison of the reactivity of SH-groups in rebuilt α - and β -domains of MTs, higher reactivity of Cu- β -domain was established.

According to Principal Component and correlative analyses, seasonal dependence of studied indices predominated in the liver, and spatial dependence was better revealed in the gills. Micronuclear test showed comparatively low level of nuclear abnormalities in fish from both sites. Nevertheless, the high levels of thiols, SH-MT and GSH, jointly with low $O_2^{\bullet -}$, PC and Me-MT levels were shown in the tissues of fish from polluted site in autumn, especially in gills. The integrated index of antioxidant-prooxidant state was calculated. It showed significantly higher antioxidative potential in the tissues of fish from polluted site compare to counterpart in autumn, especially in the gills.

Based on the peculiarities of MTs and their separated domains features, high level of antioxidative defence in the fish from polluted site was explained as the benefit of antioxidant function of Cu-MT combined with the manifestation of the weakening of the metal-binding function, particularly toward Zn.

Key words: *Carassius carassius*, metallothionein, antioxidative defense, field pollution.

РЕЗЮМЕ

Галина ФАЛЬФУШИНСКАЯ, Леся ГНАТИШИНА, Татьяна ШИМКИВ, Оксана СТОЛЯР

РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ МЕТАЛЛ-ДЕПОНИРУЮЩЕЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ФУНКЦИЙ В АДАПТАЦИИ РЫБЫ *CARASSIUS CARASSIUS* К ЕСТЕСТВЕННОМУ ЗАГРЯЗНЕНИЮ

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка,
ул. М. Кривоноса, 2, 46027 м. Тернополь, Украина,
halynka.f@gmail.com, oksana.stolyar@gmail.com

Металлотионеины (МТ) – это стрессорными белки с металл-депонирующей и антиоксидантной функциями, соотношение которых у животных из естественных водоемов не изучалось. Для оценки эффективности этих функций у рыб в условиях комплексного загрязнения среды определяли хроматографическое поведение и уровень МТ по содержанию в них металлов (Me-МТ) и тиоловых групп (SH-МТ) в печени и жабрах карася (*Carassius carassius*) из двух местностей весной, летом и осенью. Также определяли уровень глутатиона (GSH), супероксид-аниона ($O_2^{\cdot -}$) и карбонильных производных белков (КПБ). Согласно результатов факторного и корреляционного анализов, в печени преобладала сезонная зависимость показателей, а в жабрах более проявлялась зависимость от местности. Осенью наблюдали увеличение объема изоформы МТ-2/2a и доли меди в составе металлов МТ. Сравнение реакционной способности SH-групп реконструированных α - и β -доменов МТ показало что β -домен обладает более высокой реакционной способностью. Таким образом, высокое содержание тиолов SH-МТ и GSH согласованно с низким уровнем $O_2^{\cdot -}$, КПБ и Me-МТ в тканях карася из загрязненной местности, особенно в жабрах, объясняем как признак ослабления металл- депонирующей функции МТ в пользу антиоксидантной функции β -МТ. Результаты микроядерного теста подтвердили отсутствие токсического воздействия на рыбу в загрязненной местности.

Ключевые слова: *Carassius carassius*, металлотионеины, антиоксидантная защита, естественное загрязнение.

Надійшла 03.12.2009.
Після доопрацювання 08.04.2010.
Прийнята до друку 15.05.2010.