

М.Т. Гончарова

Институт гидробиологии НАН Украины, Киев

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ *CHIRONOMUS RIPARIUS* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) НА ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕДИ

Исследованы поведенческие реакции избегания *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) среды, загрязненной медью. Установлено, что выбор места откладки кладок самками, а также выбор субстрата личинками не модифицируется внесением меди в диапазоне концентраций 0,1–10,0 мг/дм³ Cu⁺².

Ключевые слова: *Chironomus riparius*, реакции избегания, медь

М.Т. Гончарова

Institute of Hydrobiology of NAS of Ukraine, Kyiv

AVOIDANCE BEHAVIOR OF *CHIRONOMUS RIPARIUS* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) TO COPPER TOXIC EFFECT

The avoidance behavior of different life stages of *Chironomus riparius*, including ovipositing females and larvae, to copper-contaminated environments was studied. Obtained data showed that none of the life stages of midges avoided copper in concentration range 0,1–10,0 mg/l Cu⁺².

Key words: *Chironomus riparius*, avoidance behavior, copper

УДК 577.352.38:577.64

Л. Л. ГНАТИШИНА¹, Г. І. ФАЛЬФУШИНСЬКА¹, О. П. ГОЛУБЄВ², Р. ДАЛЛІНГЕР³, Я. ГЬОРІ⁴, О. Б. СТОЛЯР¹

¹Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка, Тернопіль, Україна

²Міжнародний державний екологічний університет ім. А.Д. Сахарова, Мінськ, Республіка Білорусь

³Університет Інсбруку, Відділ Зоології/Екофізіології, Інсбрук, Австрія

⁴Лімнологічний науковий інститут Балатону, Тіхані, Угорщина

**МЕТАЛ-ДЕПОНУЮЧА ТА АНТИОКСИДАНТНА ФУНКЦІЇ
МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА
DREISSENA POLYMORPHA ЗА УМОВ ІСНУВАННЯ
У ПРИРОДНИХ ВОДОЙМАХ**

Виділені металотіонеїни травної залози двостулкового моллюска дрейсени *Dreissena polymorpha* з відносно чистої та забрудненої водою. Показано вищий ступінь гетерогенності, нижчу метал-депонуючу здатність та вищий вміст тіолів у металотіонеїнах дрейсени з забрудненої місцевості, що може забезпечувати компенсаторний ефект у антиоксидантному захисті в тканині за пригнічення функції супероксиддисмутази та глутатіону.

Ключові слова: металотіонеїни, дрейсена, антиоксидантний захист, природна водойма

Двостулкові моллюски є головними фільтраторами прісних водойм і характеризуються унікальною здатністю акумулювати великі кількості забруднюючих речовин. Проте їх використання у біомоніторингу стану прісних водойм на території Центральної та Східної Європи практично не реалізується [1, 2, 9]. В наших попередніх роботах було показано високу чутливість метал-депонуючої функції металотіонеїнів (МТ) аборигенних двостулкових моллюсків беззубки *Anodonta cygnea* та колетоптеру *Colletopterum pictinale* до місця відбору тварин [5, 15].

Метою цього дослідження є визначення адаптивного потенціалу МТ двостулкового моллюска-вселенця *Dreissena polymorpha*.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на особинах прісноводного двостулкового моллюска *Dreissena polymorpha* з довжиною мушлі 2,7–3,0 см і масою 2–4 г у липні 2009 року. Як модельні біотопи обрано ділянку сильно забрудненої річки Свіслоч на околиці м. Мінськ (група М) та водою джерельного походження в парку м. Тернополя з порівняно низьким рівнем забруднення (група Т). Для

дослідження використовували травну залозу молюсків. Всі процедури з відбору й обробки тканин проводили на холоді.

Вміст металотіонеїнів визначали за вмістом тіолів [7]. Одержання термостабільного екстракту та хроматографічне виділення з нього металотіонеїнів проводили шляхом послідовної хроматографії на сефадексі G-50 та ДЕАЕ-целюлозі, як описано раніше [10]. Для ідентифікації металотіонеїнів термостабільний екстракт піддавали електрофорезу в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах з додецилсульфатом Na [12].

Вміст цинку, міді та кадмію у тканині та фракціях металотіонеїнів вимірювали після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса:об'єм). Вміст цинку і міді визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115, кадмію – на спектрофотометрі S-600 і виражали в мкг та нмоль/г тканини.

Активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] вимірювали за зниженням швидкості відновлення нітротетразолію синього в присутності феназинметасульфату і НАДН [8]. Для визначення активності Mn-СОД гомогенат витримували попередньо 60 хв при 0° С в присутності 5 мМ KCN, чим досягали повного пригнічення активності Cu,Zn-СОД, а активність Cu,Zn-СОД обчислювали як різницю загальної та Mn-залежної СОД-активності. Для характеристики пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали утворення ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК). Визначення карбонільних похідних білків (КПБ) здійснювали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони [3]. Загальний вміст глутатіону визначали ферментним методом, а вміст GSSG – після обробки проби вінілпіридином [11]. Обчислювали редокс-індекс глутатіону за відношенням вмісту відновленого глутатіону до загального: $([GSH]+2[GSSG])/2[GSSG]$.

Статистичний аналіз біохімічних показників проводили з використанням пакета дисперсійного аналізу ANOVA, використовуючи комп'ютерні програми Statistica v7.0 та Excel для Windows-2000.

Всі реактиви, крім зазначених, були фірми “Реахим” кваліфікації х.ч.

Результати досліджень та їх обговорення

Присутність МТ у травній залозі дрейсени були ідентифіковано електрофоретично як білка з М 8 кДа (рис. 1А). МТ травної залози дрейсени за хроматографії на сефадексі G-50 виділяються у складі фракції з молекулярною масою (М) близько 8 кДа (МТ 8). Крім того, спостерігається вихід фракції з М близько 16 кДа (МТ 16), особливо істотний у молюсків групи М (рис. 1Б). Причому в М-групі вихід МТ 16 був вищим, ніж в Т-групі. Обидві фракції (МТ 8 та МТ 16) проявляють типові спектральні ознаки МТ (рис. 1Б, 1В) [14].

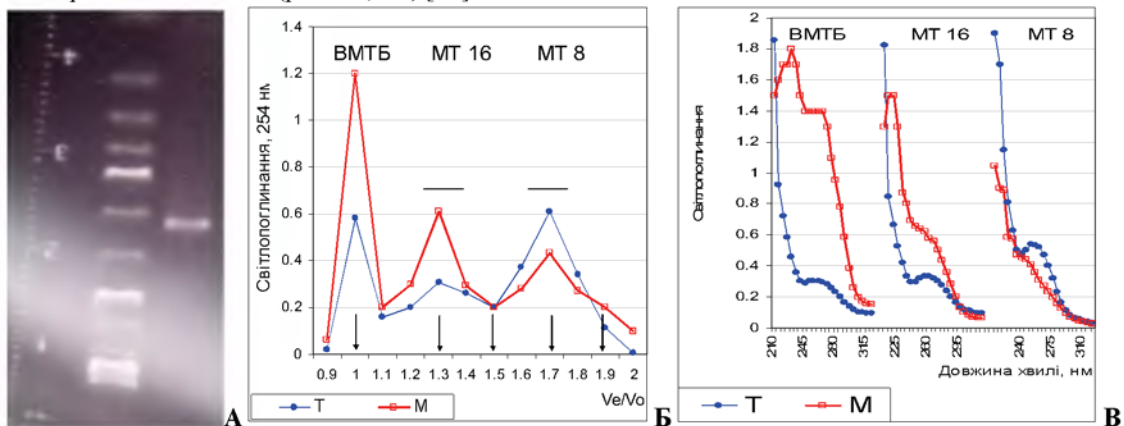


Рис. 1. Електрофореграма (А) та профілі елюції термостабільного екстракту травної залози молюска *Dreissena polymorpha* М-групи та Т-групи, одержані при гель-розподільчій хроматографії на сефадексі G-50 (Б) та УФ-спектри отриманих фракцій (В). Горизонтальною лінією показано фракції, зібрані для подальшої обробки; стрілками вказано об'єм виходу маркерних білків.

У молюсків М-групи спектральні ознаки металотіонеїнів спостерігали і у високомолекулярній фракції, що разом з високим вмістом МТ 16 свідчить про часткову олігомеризацію цих білків. Оскільки в процесі електрофорезу за денатуруючих умов була виділена

лише одна фракція МТ, то, ймовірно, що високомолекулярні металотіонеїни дрейсени є продуктами олігомеризації, а не експресії окремих генів, як це показано для морських двостулкових [13].

Обидві МТ-вмісні фракції (МТ 8 та МТ 16) були піддані хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Кожна з них утворювала типові для металотіонеїнів форми МТ-1 та МТ-2, ідентифіковані за профілем елюції стандартного розчину металотіонеїну кролика (рис. 2 А,Б), що свідчить про спільну природу фракцій з різною масою. МТ 16 утворювала і проміжну форму, МТ-2а, яка може бути результатом модифікації білків під впливом пошкоджуючих чинників середовища.

Визначення вмісту металів у травній залозі молюсків (табл. 1) показало, що у М-групі вміст міді, цинку та кадмію вищий, ніж в Т-групі, що може бути пов'язано з забрудненням місцевості. Сумарний вміст металів у складі металотіонеїнів у М-групі менший, ніж у Т-групі, що, на тлі вищого загального вмісту металів у тканині, свідчить про вищу частку металів у незв'язаній з МТ, гіпотетично токсичній формі у тканині молюсків з забрудненої місцевості. Разом з тим, вміст МТ, визначених за вмістом тіолів у їх складі, вищий у М-групі (табл. 2). Отже, невідповідність між участю МТ у депонуванні металів та потенційній їх здатності свідчить про те, що підвищена експресія цих білків може реалізуватись у іншій їх функції, ймовірно антиоксидантному захисті [7]. Крім того, вища здатність до олігомеризації МТ у дрейсени з забрудненої водойми, також, ймовірно, пов'язана з низьким рівнем залучення тіолів у метал-тіолатні кластери [10].

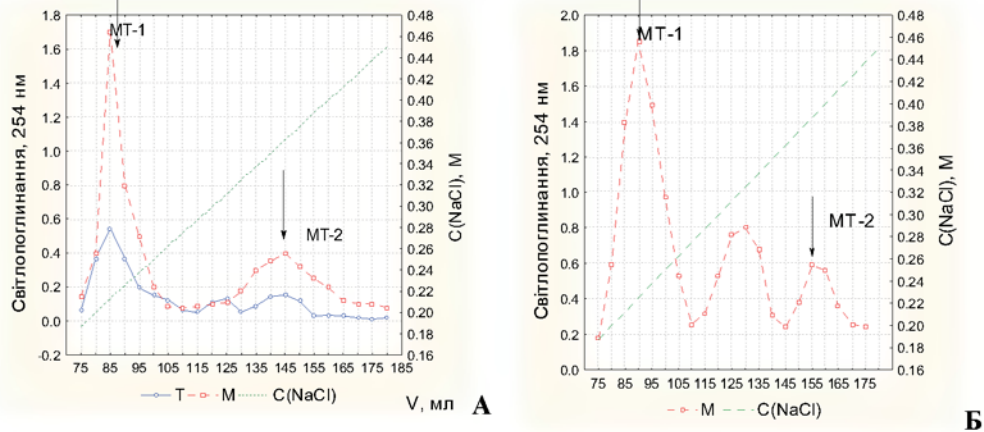


Рис. 2. Профілі елюції фракцій МТ 8 (М- та Т-групи) (А) та МТ 16 (М-групи) (Б) при іонообмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl (0–1 М) в 0,01 М трис-НСl буфері, рН 8,0. А, Б: стрілками позначено вихід фракцій металотіонеїнів МТ-1 і МТ-2 стандартного металотіонеїну печінки кролика.

Таблиця 1

Вміст металів у тканині травної залози (мкг/г сухої тканини, $M \pm m$, $n=8$) та окремих фракціях металотіонеїнів травної залози двостулкового молюска *Dreissena polymorpha* (нмоль/г тканини, $M \pm m$, $n=8$)

Метали	М-група						Разом
	Загальний вміст у тканині	МТ-10		МТ-20			
		МТ-1	МТ-2	МТ-1	МТ-2а	МТ-2	
Cu	27,7±4,1	5,8±0,6	8,0±0,7	6,9±0,6	6,9±0,7	13,0±1,4	40,6
Zn	519,6±78,9	173,9±16,2	41,7±4,0	73,1±7,4	92,8±9,5	67,4±7,4	448,9
Cd	11,0±1,1	3,8±0,4	6,9±0,7	2,8±0,2	6,3±0,6	11,7±1,0	31,5
Метали	Т-група				Разом		
	Загальний вміст у тканині	МТ-10					
		МТ-1	МТ-2				
Cu	16,9±3,2*	44,5±0,5	38,4±3,8	83,0			
Zn	143,8±34,9*	495,3±52,0	404,7±43,1	900,0			
Cd	6,5±0,8*	30,3±2,9	17,0±1,8	47,3			

Примітка: тут і далі * – відмінності значень між двома місяцями вилову вірогідні, $p < 0,05$

Порівняння показників системи антиоксидантного захисту у молюсків двох груп показало (табл. 2), що в М-групі є пригнічення головного ферменту антиоксидантного захисту СОД, причому як мітохондрійної (Мп-СОД), так і цитоплазматичної (Cu,Zn-СОД) форм, а також посилення

окисної деструкції білків. Редокс-індекс глутатіону також був нижчим у цих тварин на тлі нижчого вмісту загального глутатіону. Лише утворення ТБК-АП у тварин двох груп відрізнялося незначно.

Таблиця 2

Показники стану системи антиоксидантного захисту та вміст металотіонеїнів у травній залозі моллюска *Dreissena polymorpha*, (M±m, n=8)

Біохімічні параметри	М-група	Т-група
Активність СОД, у.о.·мг ⁻¹ білка	0,8±0,1	1,7±0,3*
Активність Cu,Zn-СОД, у.о.·мг ⁻¹ білка	0,1±0,1	0,5±0,1*
Активність Mn-СОД, у.о.·мг ⁻¹ білка	0,6±0,1	1,2±0,4*
Загальний вміст глутатіону, нмоль/г тканини	110,4±30,2	490,1±10,2*
RI GSH	0,8±0,1	1,0 ±0,1
ТБК-АП, нмоль/г тканини	16,9±0,5	20,8±2,8*
Карбонільні похідні білків, мкмоль/г білка	54,0±5,3	37,7±3,7*
Металотіонеїни, мкг/г вологої тканини	39,8±4,6	14,7±2,0
Розчинний білок, мг/г тканини	57,6±8,6	54,4±15,1*

Висновки

Результати експерименту свідчать про досить високу чутливість чинників антиоксидантного захисту досліджених тварин до умов існування, що не призводить до глибоких прооксидантних змін в тканинах. У цьому зв'язку ознаки послабленої метал-депонуючої функції за підвищеного вмісту тіолів у МТ дрейсени можуть мати компенсаторне значення у забезпеченні ефективного антиоксидантного захисту за перебування моллюсків у токсичному середовищі.

Робота виконувалась в рамках спільних міжнародних науково-технічних проєктів №Ф29/321-2009, №М/13-2009, №М/25-2009.

Автори висловлюють подяку інженеру Войтюку В.Б. за допомогу у визначенні вмісту металів у біологічних зразках.

1. Афанасьев С.А. Развитие европейских подходов к биологической оценке состояния гидроекосистем в мониторинге рек Украины / С.А. Афанасьев // Гидробиол. журн. – 2001. – Т. 37, № 5. – С. 3–18.
2. Лукашев Д.В. Оценка полиметаллического загрязнения р. Днепр методом расчета фонового содержания тяжелых металлов в моллюсках *Dreissena bugensis* / Д.В. Лукашев // Гидробиол. журн. – 2007. – Т. 43, № 6. – С. 65–80.
3. Луцак В.І. Показники оксидативного стресу. 1. Тиобарбітурактивні продукти і карбонільні групи білків / В.І. Луцак, Т.В. Багнокова, О.В. Луцак // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, № 3. – С. 136–141.
4. Металотіонеїни дрейсени *Dreissena polymorpha* як біохімічні маркери забруднення середовища / Г. Фальфушинська, Л. Гнатишина, Х. Прийдун, О. Столяр // Праці НТШ. Хем. Біохем. – 2008. – Т. 21. – С. 282–290.
5. Столяр О.Б. Система антиоксидантної захисту в тканинах прісноводного двустворчатого моллюска *Colletopterum pictinale* (Unionidae) в условиях естественного водоема и переселения / О. Б. Столяр, Г. И. Фальфушинская, О.Г. Базан // Гидробиол. журн. – 2008. – Т. 44, № 3. – С. 58–68.
6. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview / A. Viarengo, B. Burlando, N. Ceratto, I. Panfoli // Cell Mol. Biol. – 2000 – Vol. 46, № 2. – P. 407–417.
7. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs / A. Viarengo, E. Ponzano, F. Dondero, R. Fabbri // Marine Environmen. Res. – 1997. – Vol. 44. – P. 69–84.
8. Beauchamp C. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels / Beauchamp C., Fridovich I. // Anal. Biochem. – 1971. – Vol. 44. – P. 276–287.
9. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada) / Y.De Lafontaine, F.Gagne, C. Blaise [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2000. – Vol. 50. – P. 51–71.
10. Falfushynska H. I. Reactivity of metallothioneins in frog *Rana radibunda* treated by copper and zinc ions / H.I. Falfushynska, L.D. Romanchyk, O.B. Stolyar // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 3. – С. 17–26.
11. Griffith O.W. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine / O.W. Griffith // Anal. Biochem. – 1980. – Vol. 106. – P. 207–212.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–684.

13. *Metallothioneins* in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers / J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, S. Barka [et al.] // *Aquatic Toxicology*. – 2006. – Vol. 76. – P. 160–202.
14. *Metallothioneins* in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers / R. Dallinger, B. Berger, C. Gruber [et al.] // *Cell. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 46, N 2. – P. 331–346.
15. *Multi-biomarkers* approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister basin (Ukraine) / H.I. Falfushynska, L. Delahaut, O.B. Stolyar [et al.] // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2009. – Vol. 57, N 1. – P. 86–95.

Л.Л. Гнатышина¹, Г.И. Фальфушинская, А. П. Голубев², Р. Даллингер³, Я. Ёйори⁴, О.Б. Столяр¹

¹Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка, Тернополь, Украина

²Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова, Минск, Республика Беларусь

³Университет Инсбрука, Отдел Зоологии и Экофизиологии, Инсбрук, Австрия

⁴Лимнологичний научний інститут Балатона, Тихани, Венгрия

МЕТАЛЛ-ДЕПОНУЮЩАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ ФУНКЦИИ

МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *DREISSENA POLYMORPHA* В УСЛОВИЯХ ЕСТЕСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ

Выделены металлотиионеины пищеварительной железы двустворчатого моллюска дрейссены *Dreissena polymorpha* из относительно чистого и загрязненного водоемов. Показано более высокую степень гетерогенности, более низкую металл-депонирующую способность и повышенный уровень тиолов в металлотиионеинах дрейссены из загрязненной местности, что может обеспечивать компенсаторный эффект в антиоксидантной защите в ткани при угнетение функции супероксиддисмутазы и глутатиона.

Ключевые слова: металлотиионеины, дрейссена, антиоксидантная защита, естественный водоем

L. L. Gnatyshyna¹, H. I. Falfushynska¹, A. P. Golubev², R. Dallinger³, J. Jiory⁴, O. B. Stolyar¹

¹Ternopil National Volodymir Hnatiuk Pedagogical University, Ternopil, Ukraine

²International state ecological university of the name of A.D. Sakharov, Minsk, Republic of Byelorussia

³University of Innsbruck, Department of Zoology / Ekophyziologi, Innsbruck, Austria

⁴Limnology scientific institute of Balaton, Tikhani, Hungary

METAL-BINDING AND ANTIOXIDATIVE FUNCTIONS OF METALLOTHIONEINS IN BIVALVE MOLLUSK *DREISSENA POLYMORPHA* FROM FIELD WATER BODIES

The metallothioneins from the digestive gland of bivalve mollusk zebra mussel *Dreissena polymorpha* inhabiting comparatively clean and polluted aquatic sites were separated. Higher rate of the heterogeneity, lower metal-binding ability and higher level of thiols was shown for the metallothionein of mussels from polluted site that might compensate the lack of the function of the superoxide dismutase and glutathione.

Key words: metallothioneins, dreissena, antioxidative defense, field aquatic body

УДК 574.5(28) : 574.583 + 57.047

Т.В. ГОЛОВКО, В.М. ЯКУШИН, Н.И. ТРОНЬКО, К.П. КАЛЕНИЧЕНКО,

Л.И. БАГНЮК

Институт гидробиологии НАН Украины

пр-т Героев Сталинграда, 12, Киев 04210

БАКТЕРИОПЛАНКТОН КИЕВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА И ЕГО ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАЛАНС

Осуществлен ретроспективный анализ формирования микробиологического режима Киевского водохранилища и потока энергии через бактериопланктон. Изучены его структурно-функциональные показатели на современном этапе. Установлен циклический характер многолетней динамики развития планктонных бактерий, что, очевидно, связано с флуктуациями природных абиотических и биотических факторов, влияющих на функционирование экосистемы водохранилища.