

СРАВНИТЕЛЬНОЕ изучение влияния меди и марганца на состав металлов в тканях карася и их металлотионеинах в зависимости от исходных условий существования **ПОПУЛЯЦИИ:** АДАПТАЦИЯ И ТОКСИЧНОСТЬ

В работе исследовали влияние ионов Cu и Mn водной среды на содержание тяжелых металлов в тканях карася *Carassius auratus*, в том числе на их концентрацию в металлотионеинах (МТ) в зависимости от исходных условий существования популяции. Содержание Cu, Zn и Mn в тканях контрольных рыб из загрязненного водоема было ниже, а Cd – выше, чем у рыб из условно чистого водоема. Показано, что карась из загрязненного водоема теряет способность формировать адаптивный ответ на действие дополнительного повреждающего фактора. Это приводит к несбалансированным изменениям содержания металлов в жабрах и их МТ и увеличению уровня металлов в потенциально-токсичной форме. Оценка металлсвязывающей способности МТ дает более полное представление о состоянии организма, чем общее содержание тяжелых металлов в тканях.

Введение

Загрязнение окружающей среды медью и марганцем, обусловленное их широким использованием в качестве компонентов удобрений, различных биоцидов, биодобавок для животных и т.д., приобретает угрожающие масштабы. Небольшие количества меди и марганца необходимы для нормальной жизнедеятельности организма, однако в высоких концентрациях эти металлы токсичны. Накапливаясь в тканях, медь и марганец могут инициировать прооксидантные процессы, вызывать цитотоксический, мутагенный и канцерогенный эффекты [1-3]. Известно, что степень токсичности тяжелых металлов (ТМ) обусловлена количеством

свободных ионов или активностью их кинетически лабильных комплексов в большей мере, чем общим содержанием ТМ в тканях [3]. Несмотря на это, основное внимание при оценке состояния организма в условиях воздействия ТМ направлено именно на анализ их общего содержания в тканях [4, 5].

Металлотионеины (МТ) – низкомолекулярные белки цитозоля с высоким содержанием серы и ионов d-металлов, известные у широкого круга организмов. Эти белки выполняют депонирующую и детоксикационную функцию по отношению к ионам меди, цинка и кадмия [6, 7]. В последнее время в литературе появляется все больше сведений о том, что не всегда интенсивный синтез МТ является показателем загрязнения среды, а даже наоборот, в высокотоксичной среде наблюдается угнетение их синтеза у ряда пресноводных животных [8], что может существенно влиять на состояние металл-детоксикационной системы и адаптивной реакции организма в целом. Кроме этого, взаимосвязь между толерантностью организма к ТМ и концентрацией МТ доказана только для кадмия, тогда как относительно других металлов наблюдаются разногласия [6, 7, 9].

Рыбы, в отличие от других позвоночных, могут концентрировать значительные количества металлов из воды, в связи с чем успешно используются для оценки качества водной среды, а также прогнозирования ее потенциальной опасности для человека. Особого внимания среди пресноводных рыб

Г.И. Фальфушинская*,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НДЛ сравнительной биохимии и молекулярной биологии, Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка

* Адрес для корреспонденции: halynka.f@gmail.com

заслуживает карась *Carassius auratus*, который характеризуется высокой экологической пластичностью и повышенной резистентностью к загрязняющим веществам [10]. Несмотря на это, в последние годы в пресных водоемах наблюдается массовая гибель именно карася и причины этого не установлены. Карась является популярным видом в лабораторном эксперименте [11]. В связи с этим данный вид был выбран объектом исследования, имеющего целью сравнить уровень накопления металлов в тканях и металлсвязывающую способность МТ животных из двух популяций, отличающихся по качеству среды обитания, при влиянии на организм ионов меди и марганца.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили в августе 2009 г. на половозрелых особях карася (*Carassius auratus*, *Cyprinidae*). Экземпляры длиной 15-20 см и массой тела 150-180 г были отобраны из двух водоемов бассейна р. Днестр – рыбо-хозяйственного пруда в урочище Заложцы (49°49' / св.ш., 25°23' / в.д.) в верхнем течении р. Серет (З-группа) и пруда в нижнем течении р. Ничлава (48°48' / св.ш., 26°00' / в.д.), около 10 км от г. Борщов, где не работают очистительные сооружения, в районе относительно высокой аграрной активности (Б-группа). В водоеме З-группы уровень физико-химических параметров не превышает допустимых норм [12]. В водоеме Б-группы содержание меди варьирует от $3,4 \pm 0,2$ до $39,4 \pm 1,8$ мкг/л в зависимости от сезона, что превышает допустимые нормы Европейского союза в 2-20 раз (tiras.vox.md/

[books/book.pdf](#)). Также водоем Б-группы сильно загрязнен нитритами (2-40 ПДК) и фосфатами (10-22 ПДК) [12]. Рыб адаптировали в течение 7 сут к условиям бассейна. Из рыб, отобранных в каждом водоеме, были сформированы контрольная группа и группы, которым в воду добавляли соли меди (CuSO_4) или марганца (MnCl_2) в концентрациях 0,005, 0,05 мг/л Cu^{2+} и 0,17, 1,7 мг/л Mn^{2+} . Концентрацию металлов в бассейнах контролировали методом атомно-адсорбционной спектрофотометрии. Добавление анионов солей существенно не влияло на их общее содержание в воде и не создавало условий для осаждения ионов из раствора. Экспериментальные условия создавали в бассейнах объемом 200 л, где рыб содержали по 8 экземпляров на протяжении 14 сут. при температуре 18 °С в отстоянной, хорошо аэрированной воде, которую меняли каждые 2 сут., обновляя в ней содержание ТМ. Животных кормили сухим гранулированным кормом для рыб (Аквариус, Харьков). Животных умерщвляли с соблюдением этических норм в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986), а также решением Первого национального конгресса по биоэтике (Киев, 2000). Для анализа использовали печень и жабры карася. Все процедуры по отбору и обработке органов проводили на холоде. Все реактивы, кроме указанных, были произведены фирмой «Реахим» и имели степень чистоты «хч».

МТ выделяли как термостабильные белки с помощью ионно-обменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе («Sigma»), как описано



ранее [13], с использованием 10 % гомогената ткани в 10 мМ трис-НСl буфере, рН 8,0 с добавлением 10 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma») и ингибитора протеаз фенилметилсульфонилфторида (0,1 мМ, «Sigma»). Образцы исследуемых органов высушивали в течение 6 ч до постоянной массы при 105 °С взвешивали и минерализовывали концентрированной HNO₃ марки ОСЧ. Содержание марганца, цинка и меди в тканях и фракциях МТ после минерализации определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре С-115, кадмия – на спектрофотометре S-600 и выражали в мкг на г сухой массы органа или нмоль на г влажной ткани. Контроль качества определений включал измерение концентраций металлов в используемых кислотах, а также дубликатах проб методом стандартных добавок. Нижний диапазон определения металлов составляет 0,1 (1 для кадмия) мкг/г ткани. Сравнительный анализ биологических параметров проводили с помощью программ описательной статистики, пакета дисперсионного анализа Anova, дискриминантного анализа, построения классификационных деревьев с алгоритмом CART, используя компьютерные программы Statistica v 7.0 и Exel для Windows-2000.

Результаты и их обсуждение

Определение общего содержания металлов в тканях интактных животных, обитавших в условно чистом водоеме (З-группа), свидетельствует, что содержание меди, цинка и марганца было у них существенно выше, чем у рыб из загрязненного водоема (Б-группа). Вместе с этим, содержание кадмия было выше в тканях животных Б-группы (табл. 1).

Экспозиция животных в присутствии повышенных концентраций меди вызывает увеличение содержания этого металла только в жабрах карася Б-группы при действии низкой ее концентрации (рис. 1). В остальных

Ключевые слова:

карась,
медь,
марганец,
металлотioneины,
адаптация

случаях содержание меди в тканях животных уменьшается, независимо от исходной среды существования организмов. Медь вызывает также изменения содержания и других исследуемых металлов. Так, при действии низкой концентрации меди уменьшается уровень цинка и марганца в печени животных З-группы, а также кадмия в обеих группах, а при действии высокой концентрации уменьшается уровень цинка и увеличивается содержание кадмия в тканях животных обеих групп, за отдельными исключениями. Изменения содержания марганца носят ткане- и территориально-специфический характер. Наиболее существенные изменения связаны с увеличением в 3-5 раз содержания марганца в печени карася из загрязненной территории, при действии высокой концентрации меди.

Действие марганца на рыб вызывает увеличение содержания этого металла в печени животных З-группы в линейной зависимости от увеличения его концентрации в воде, а в печени карася Б-группы и жабрах З-группы – только при высокой его концентрации (рис. 1). В жабрах животных Б-группы уровень марганца уменьшается. Марганец, как и медь, влияет на содержание других металлов, причем более существенно при воздействии его высокой концентрации. При этом наблюдается увеличение содержания меди, цинка и кадмия в печени животных обеих групп, за отдельными исключениями, а в жабрах – уменьшение содержания меди и увеличение кадмия у карасей З-группы, и увеличение содержания меди у животных Б-группы.

Обработка результатов определения ТМ в тканях карася методом дискриминантного анализа свидетельствует, что вид действующего металла и популяционная история рыб существенно влияют на вариабельность исследуемых показателей. Однако исходные условия обитания популяции влияют более существенно ($F(4,55) = 15,9$ $p < 0,0001$), чем вид дополнительного повреждающего фактора ($F(16,159) = 5,7$ $p < 0,001$).



Таблица 1

Содержание тяжелых металлов (мкг/г сухой массы) в тканях интактных животных из двух популяций

Металл	Печень		Жабры	
	З-группа	Б-группа	З-группа	Б-группа
Cu	14,2±2,8	8,1±0,6	15,4±2,8	9,6±1,4
Zn	168,3±23,2	139,7±7,9	712,5±39,3	601,7±25,1
Cd	5,2±0,8	7,7±0,8	3,8±0,9	7,3±0,6
Mn	6,2±1,3	2,1±0,3	14,1±2,9	25,2±1,0

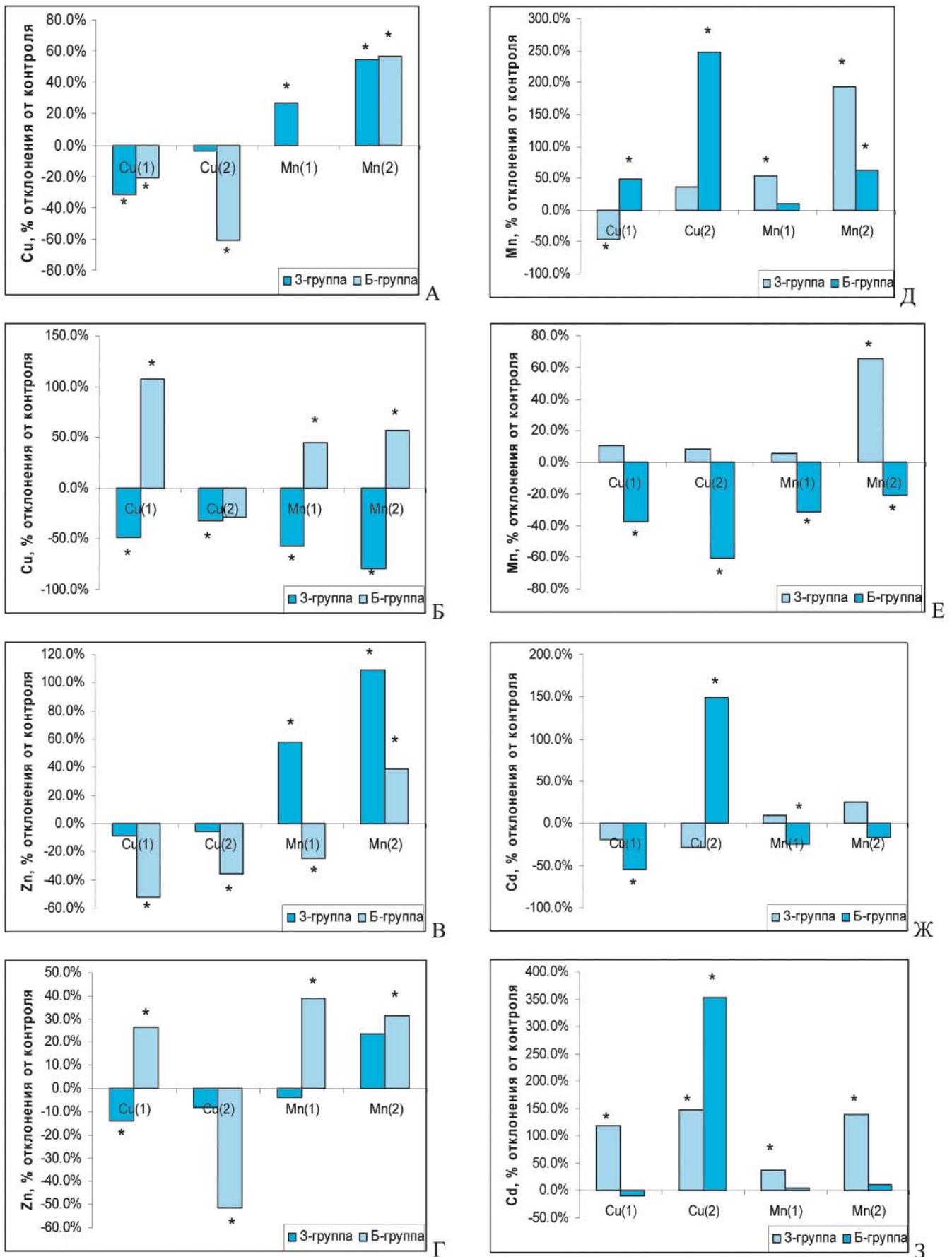


Рис. 1. Содержание тяжелых металлов (% отклонения от контроля) в печени (А, В, Д, Ж) и жабрах (Б, Г, Е, З) при действии меди и марганца на организм.

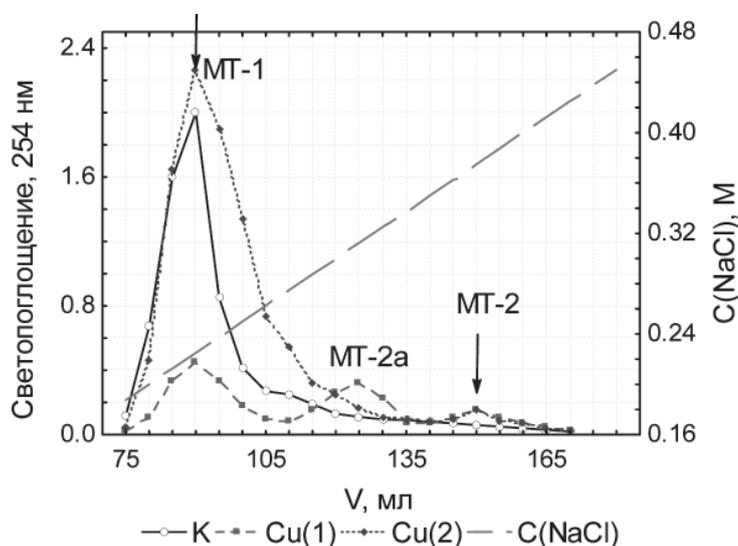


В связи с особенностями изменения состава металлов в тканях караса при действии повреждающих факторов и учитывая, что токсичность тяжелых металлов проявляется при неспособности металлсвязывающих белков МТ эффективно утилизировать и аккумулировать тяжелые металлы [6, 7, 9, 13], представляло интерес исследовать металлсвязывающую способность МТ в тех же условиях.

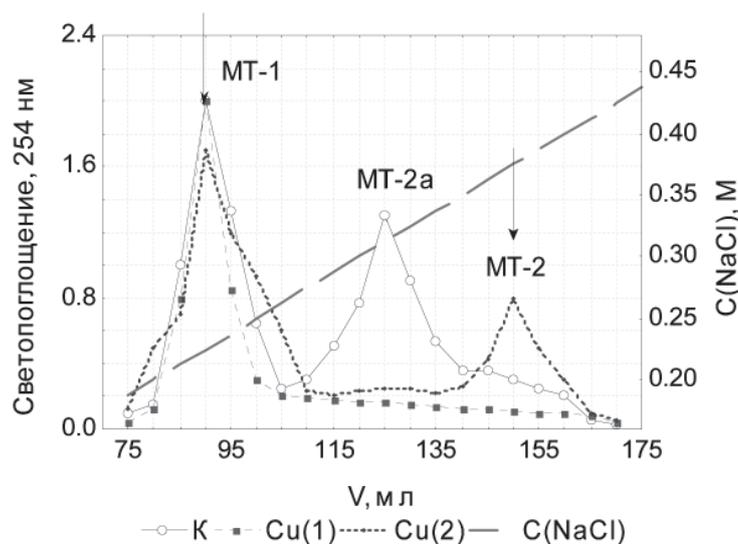
МТ в процессе ионообменной хроматографии образуют две изоформы, идентифицированные как МТ-1 и МТ-2 соответственно профиля элюции стандартного МТII кролика (рис. 2). Главная форма МТ-1 элюируется при 0,24 М NaCl, а МТ-2 – при 0,39 М NaCl. Содержание минорной формы МТ-2 варьирует в зависимости от условий существования караса и характеризуется микрогетерогенностью с возникновением дополнительной формы МТ-2а при 0,32 М NaCl, которая отсутствует в печени животных 3-группы в контроле.

По составу металлов МТ караса относятся к Zn-МТ (табл. 2). Соотношение Zn:Cu:Сd составляет для МТ печени/жабр животных 3- и Б-групп в контроле, соответственно, 22,5:1,9:1/ 18,6:2,7:1; и 35:5,5:1/28:5:1. Металлсвязывающая способность МТ интактных животных 3-группы выше, чем Б-группы. В экспериментальных условиях, независимо от вида действующего металла, в печени животных 3-группы в МТ-1, а в Б-группе еще и МТ-2а/2 уменьшается содержание цинка и меди, в 3-группе даже до уровня предела определения, за отдельными исключениями. Относительно кадмия изменения носят территориально-специфический характер, уменьшение его уровня в МТ-1, за одним исключением – у животных 3-группы и увеличение в МТ-1 и МТ-2а/2 у животных Б-группы. В жабрах наиболее существенные изменения связаны с уменьшением содержания меди в МТ-1 3-группы и увеличением кадмия в МТ-1 и МТ-2а/2 животных обеих групп.

С целью поиска показателей, которые достоверно позволяют оценить загрязнение окружающей среды медью и марганцем, мы провели интегральный анализ содержания металлов в тканях и изоформах МТ караса методом построения классификационных деревьев (рис. 3) [14]. Полученные результаты свидетельствуют, что к распределительным критериям состояния организма при влиянии меди и марганца с высокой степенью вероятности относятся содержание меди и кадмия в МТ-2а/2 и марганца в печени, а также меди и цинка в изоформах МТ и марганца в жабрах. К показателям эффекта экс-



А



Б

Рис. 2. Типичные профили элюции термостабильных белков печени (А) и жабр (Б) караса в контроле и при действии тяжелых металлов на организм.

позиции, независимо от природы действующего металла, при суммарном анализе данных относятся содержание кадмия в МТ-2а/2 и марганца в печени, а также меди в изоформах МТ жабр карася (рис. 3 В, Е).

Анализ содержания металлов в тканях карася свидетельствует, что в интактных животных из загрязненного водоема уровень меди, цинка и марганца ниже, а кадмия выше, чем в условно чистом водоеме. Очевидно, это связано с нарушением функционирования транспортных систем вследствие некроза и апоптоза хлоридных и респираторных клеток жабр [15], а также структуры акцепторов металлов в клетках. Подобное наблюдалось нами [13, 16] и для печени лягушки и карпа из загрязненного водоема, как уменьшение биодоступности цинка и меди, а также другими авторами [5] у плотвы и карпа, как увеличение содержания кадмия.

Тенденции, отмеченные для состава металлов в тканях интактных животных, совпадают с таковыми и для МТ. Очевидно, МТ карасей Б-группы, для которых наблюдается более низкое содержание металлов, чем у З-группы, характеризуются снижением металл-депонирующей функции. Это может быть связано с загрязнением исходной среды обитания не только ТМ, но и веществами органической природы, которые могут вызывать окислительную деструкцию металл-тиолатных кластеров [17], а, соответственно, и ослабление металл-детоксикационных свойств МТ. Таким образом, можно предположить, что ослабление способности МТ эффективно связывать металлы является признаком токсичности среды обитания.

Действие меди на карасей из двух популяций вызывает территориально-специфические изменения содержания этого металла в жабрах. В частности, у животных З-группы концентрация меди в жабрах уменьшается независимо от ее концентрации в воде, а у Б-группы – увеличивается вдвое при действии низкой концентрации меди. Принимая во внимание литературные данные [17, 18], уменьшение накопления меди, которая для карася является осморегуляторным токсикантом [11], можно расценивать как признак толерантности и формирования адаптивного ответа у животных из условно чистого водоема. К возможным механизмам развития устойчивости организма можно отнести ослизнение жабр и усиление элиминационных процессов, но не металл-детоксикационных свойств МТ, как это было отмечено для форели в условиях предэкспозиции [17], поскольку в нашем эксперименте содержание меди в МТ не увеличивалось. Признаки более высокой толерантности животных

Таблица 2

Содержание тяжелых металлов (нмоль/г ткани) в изоформах металлотионеинов тканей животных из двух популяций в контроле и при действии меди и марганца

Металл	Группа животных	З-группа		Б-группа	
		МТ-1	МТ-2а/2	МТ-1	МТ-2а/2
Печень					
Cu	Контроль	7,8±0,8	X	4,8±0,5	7,2±0,7
	Cu(1)	1,6±0,2	14,1±1,3	4,4±0,4	9,8±1,0
	Cu(2)	НДО	3,1±0,3	2,3±0,2	4,4±0,4
	Mn(1)	НДО	НДО	3,8±0,4	2,8±0,3
	Mn(2)	1,6±0,2	7,8±0,8	1,1±0,1	6,4±0,5
Zn	Контроль	92,3±9,1	X	41,5±4,1	35,4±3,4
	Cu(1)	76,9±6,8	67,7±7,1	30,8±2,7	10,8±1,1
	Cu(2)	69,2±6,5	16,9±1,4	26,2±2,1	9,2±0,9
	Mn(1)	73,8±7,1	73,8±7,8	21,5±1,9	6,2±0,6
	Mn(2)	96,9±9,7	21,5±2,1	18,5±1,5	15,4±1,5
Cd	Контроль	4,1±0,4	X	1,2±0,1	1,1±0,1
	Cu(1)	0,5±0,0	9,3±0,9	2,3±0,2	5,6±0,6
	Cu(2)	0,5±0,0	6,8±0,7	3,2±0,3	7,2±0,8
	Mn(1)	4,3±0,4	4,9±0,4	3,9±0,4	6,2±0,6
	Mn(2)	0,5±0,0	6,0±0,5	3,6±0,4	6,2±0,6
Жабры					
Cu	Контроль	6,3±0,6	10,9±1,1	4,4±0,4	6,9±0,6
	Cu(1)	НДО	4,7±0,4	4,4±0,4	X
	Cu(2)	НДО	18,8±2,0	4,2±0,4	6,4±0,6
	Mn(1)	НДО	X	2,0±0,2	3,1±0,3
	Mn(2)	НДО	4,7±0,4	2,3±0,2	X
Zn	Контроль	86,2±8,1	30,8±3,1	30,76923	30,76923
	Cu(1)	103,1±9,7	18,5±1,6	18,46154	X
	Cu(2)	104,6±9,6	18,5±1,5	32,30769	24,61538
	Mn(1)	55,5±5,1	X	24,61538	20
	Mn(2)	64,6±6,0	36,9±4,0	32,30769	X
Cd	Контроль	0,7±0,1	5,5±0,5	1,2±0,1	1,1±0,1
	Cu(1)	1,7±0,2	5,4±0,5	3,6±0,3	X
	Cu(2)	1,3±0,1	9,7±1,0	3,5±0,3	7,1±0,7
	Mn(1)	1,3±0,1	X	4,8±0,4	9,0±0,8
	Mn(2)	1,1±0,1	8,5±0,8	6,7±0,7	X

Примечание. НДО – содержание металла ниже диапазона определения, X – фракция отсутствует



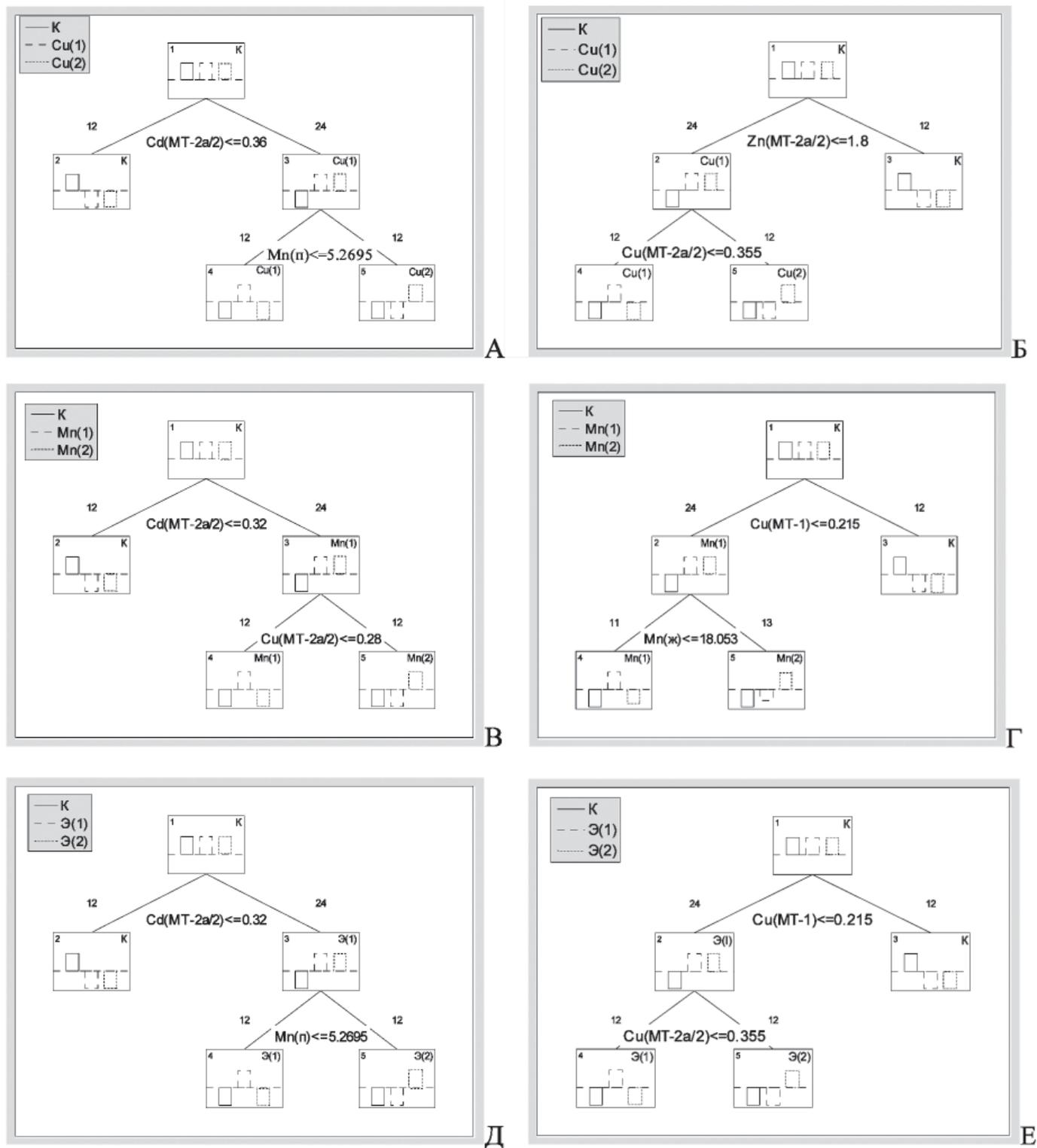


Рис. 3. Классификационные деревья распределения экспериментальных групп животных в зависимости от природы действующего фактора. К – контроль, Э (1) и Э (2) – экспозиция животных в присутствии ионов меди и марганца.

Э-группы к действию меди проявляются и в тканях печени. Однако, в отличие от жабр, в печени в регуляционные процессы активно вовлекаются МТ через увеличение их медь-связывающей функции.

Как известно, рыбы более чувствительны к воздействию марганца, чем млекопитающие [2]. Однако эти данные ограничены гематологическими и неврологическими исследованиями в условиях острой токсичности [19], а данные относительно влияния сравнительно низких концентраций практически отсутствуют [20]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что действие марганца на карася вызывает разные для различных тканей модели ответа в зависимости от усло-

вий существования животного и концентрации данного металла в воде. Более существенные отличия наблюдаются в жабрах, где у животных 3-группы содержание марганца увеличивается по сравнению с контролем при действии высокой его концентрации, а у животных Б-группы – уменьшается независимо от концентрации марганца в воде. Также изменяется соотношение медь/марганец в ткани – у животных 3-группы в сторону уменьшения, а у животных Б-группы – увеличения. Принимая во внимание схожесть строения бивалентных катионов меди и марганца [21], что обуславливает возможность конкуренции между ними за участки связывания металлов, а также антагонистические отношения между этими металлами в тканях карпа [20], можно предположить, что у карася из условно чистого водоема наблюдается адекватная реакция на повышенное содержания марганца в среде, а у животных из загрязненного водоема – нарушение транспортных систем, которое можно расценивать как признак токсичности [22]. Эти признаки токсичности имеют сходные черты, установленные при сравнении животных интактных групп из двух исследованных водоемов.

В нашем эксперименте наиболее существенные изменения металл-связывающей способности МТ-1 касаются меди, причем, согласно результатам дискриминантного анализа ($p < 0.0001$), они в большей мере территориально-специфические, чем определены природой действующего фактора. В МТ-1 тканей животных 3-группы в услови-

ях экспозиции содержание меди уменьшается к уровню детекции, а в Б-группы – на 10-55 % по сравнению с контролем. У животных 3-группы изменения медь-связывающей способности МТ и содержания меди в ткани носят сбалансированный характер, с частичной компенсацией связывания меди в ткани в МТ-2а/2. Вместе с этим в Б-группе увеличение содержания меди в печени и особенно в жабрах сопровождается, зачастую, снижением медь-связывающей активности МТ и, соответственно, увеличением содержания меди в токсичной, не связанной с МТ формой. Это может быть одной из причин усиления свободно-радикальных процессов в клетках животных из загрязненного водоема, при дополнительной нагрузке за счет поступления в организм других ТМ. Подобную ситуацию наблюдали у карпа из природного водоема в виде уменьшения содержания меди в МТ-1 в сочетании с усилением перекисного окисления липидов и образованием супероксиданиона в тканях [23]. Таким образом, анализ металлсвязывающей способности МТ дает более полное представление о состоянии организма, чем общее содержание металлов в ткани.

Содержание кадмия в МТ-2а/2 печени в процессе построения классификационного дерева было отобрано как универсальный показатель, который позволяет отличить интактных животных от тех, которые находятся под влиянием ТМ. Из литературы также известно, что МТ-2 является главной кадмий-связывающей формой в печени позвоночных животных [24]. Принимая во вни-





мание, что экспрессия этой формы у рыб регулируется кадмием [25], логично предположить, что Cd-связывающая способность МТ-2 печени рыб является неспецифическим показателем стресса, вызванного воздействием ТМ независимо от их вида.

Заключение

Таким образом, у интактных рыб из загрязненного водоема зарегистрированы признаки токсичности на основании анализа содержания металлов в их тканях и тканевых МТ. Жабры карася демонстрируют более высокую чувствительность и селективность при действии ТМ, чем печень. При действии дополнительного повреждающего фактора в виде дополнительной порции ТМ рыбы, которые уже находятся в условиях стресса, теряют способность формировать адаптивный ответ, по сравнению с животными из условно чистого водоема. Это приводит к несбалансированным изменениям содержания ТМ в их жабрах и МТ, а также увеличению концентрации этих металлов в потенциально-токсичной форме. Анализ металлсвязывающей способности МТ дает более полное представление о состоянии организма, чем общее содержание ТМ в ткани.

Работа выполнена при поддержке МОН Украины в рамках Украинско-Корейской НИР № М/256-2008 а также Западно-Украинского Биомедицинского центра. Автор благодарна руководителю проекта проф. Столяр О.Б., а также м.н.с. Гнатишиной Л.Л и Касянчуку М.Н. за техническую поддержку.

Литература

1. Stohs S.J. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions / S.J. Stohs, D. Bagchi // Free Radic. Biol. Med., 1995. V. 18. P. 321-336.
2. Mineral tolerance of animals. Second revised edition, 2005. // National Research Council (U.S.). Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals. Электронный ресурс: <http://books.google.com.au/books?id=k0wYvnlydGIC&printsec=frontcover&hl=ru#v=onepage&q&f=false>
3. Campbell P.G.C. Interaction between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic System. // Wiley, New York. 1995. P. 45-102.
4. Лукашев Д. В. Содержание тяжелых металлов в воде и двустворчатых моллюсках на разных участках русла реки Южный Буг // Водные ресурсы. 2010. Т. 37, № 3. С. 351-355.
5. Reynders H. Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient / H. Reynders, L. Bervoets, M. Gelders [et al.] // Sci. Total Environ., 2008. V. 391. P. 82-95.
6. Roesijadi G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals // Aquat. Toxicol., 1992. V. 22. P. 81-114.
7. Viarengo A. Metallothionein as a tool in bio-monitoring programmes / A. Viarengo, B. Burlando, F. Dondero [et al.] // Biomarkers, 1999. V. 4. P. 455-466.
8. Auslander M. Pollution-affected fish hepatic transcriptome and its expression patterns on exposure to cadmium / M. Auslander, Y. Yudkovski, V. Chalifa-Caspi [et al.] // Mar. Biotechnol., 2008. V. 10, N 3. P. 250-261.
9. Данилин И.А. Металлотионеины как биомаркеры при действии на организмы тяжелых металлов и ионизирующего излучения. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2010. 46 с.
10. Nilsson G.E. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark / G.E. Nilsson, G.M.C. Renshaw // J. Exp. Biol., 2004. V. 207. P. 3131-3139.
11. De Boeck G. Copper toxicity in gibel carp *Carassius auratus gibelio*: Importance of sodium and glycogen / G. De Boeck, R. Smolders, R. Blust // Comp. Biochem. Physiol., 2010. V. 152C, N 3. P. 332-337.
12. Falfushynska H.I. Variability of responses in the crucian carp *Carassius carassius* from two Ukrainian ponds determined by multi-marker approach / H.I. Falfushynska, L.L. Gnatyshyna, C.V. Priyden [et al.] // Ecotoxicol Environ Saf., 2010. V. 73, N 8. P. 1896-1906.

13. Falfushynska H.I. Function of metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine / H.I. Falfushynska, O.B. Stoliar // *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2009. V. 72. P. 1425-1432.
14. Chèvre N. Application of rough sets analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods / N. Chèvre, F. Gagné, P. Gagnon, C. Blaise // *Chemosphere*, 2003. V. 51, N 1. P. 13-23.
15. Lauren D.J. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: biochemistry / D.J. Lauren, D.G. McDonald // *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 1987. V. 44. P. 105-111.
16. Stolyar O.B. Comparison of metal bio-availability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine / O.B. Stolyar, N.S. Loumbourdis, H.I. Falfushynska, L.D. Roman-chuk // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2008. V. 54. P. 107-113.
17. Hansen B.H. Gill metal binding and stress gene transcription in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to metal environments: the effect of pre-exposure in natural populations / B.H. Hansen, O.A. Garmo, P.A. Olsvik, R.A. Andersen // *Environ. Toxicol. Chem.*, 2007. V. 26, N 5. P. 944-953.
18. Gale S.A. Insights into the mechanisms of copper tolerance of a population of black-banded rainbow fish (*Melanotaenia nigra*) (Richardson) exposed to mine leachate, using $^{64}/^{67}\text{Cu}$ / S.A. Gale, S.V. Smith, R.P. Lim [et al.] // *Aquat. Toxicol.*, 2003. V. 62. P. 135-153.
19. Agrawal S.J. Haematological responses in a fresh water fish to experimental manganese poisoning / S.J. Agrawal, A.K. Srivastava // *Toxicology*, 1980. V. 17, № 1. P. 97-100.
20. Столяр О.Б. Роль металотіонеїнів в детоксикації іонів міді, цинку, марганцю та свинцю в організмі прісноводних риб і молюсків. Автореф. дис. ... д-ра. біол. наук. Львів, 2004. 30 с.
21. Гринберг А. А. Введение в химию комплексных соединений // М.: Химия, 1966. 631 с.
22. Partridge G.J. Effects of manganese on juvenile mulloway (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity—Implications for inland mariculture / G.J. Partridge, A.J. Lymbery // *Aquaculture*, 2009. V. 290, № 3-4. P. 311-316.
23. Falfushynska H.I. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine / H.I. Falfushynska, O.B. Stolyar // *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2009. V. 72. P. 729-736.
24. Das K. White-sided dolphin metallothioneins: purification, characterisation and potential role / K. Das, V. Debacker, J.M. Bouqueneau // *Comp. Biochem. Physiol.*, 2002. V. 131C, № 3. P. 245–251.
25. Wu S.M. Expression of mt2 and smt-B upon cadmium exposure and cold shock in zebrafish (*Danio rerio*) / S.M. Wu, Y.D. Zheng, C.-H. Kuo // *Comp. Biochem. Physiol.*, 2008. V. 148, № 2. P. 184-193.



G. I. Falfushinskaya

COMPARATIVE ANALYSIS OF Cu -, Mn - INFLUENCE ON THE CONTENT OF HEAVY METALS IN THE TISSUES OF THE CRUCIAN CARP IN TERMS OF LIVING CONDITIONS OF THE POPULATION

The effect of Cu and Mn ions of the aquatic media on the content of heavy metals in the tissues of the crucian carp *Carassius auratus*, including their concentrations in metallothioneins (MTs) were investigated depending on living conditions of the population. The Cu , Zn and Mn concentrations in the tissues of control fish from the

polluted site was lower, and Cd was higher compare to fish from the relatively clean site. It was shown that crucian carp from polluted site loses its ability to generate an adaptive response to the action of an additional damaging factor. That leads to unbalanced changes in metal concentrations in the gills tissue and their MTs and increased levels of

metals in potentially toxic forms. The evaluation of metal-binding ability of MTs provides perfect image about the health status of organisms than the total content of heavy metals in the tissues.

Key words: crucian carp, copper, manganese, metallothioneins, adaptation