

**ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТА МЕДИ НА РОСТ, ВЫЖИВАЕМОСТЬ И УРОВЕНЬ
ЭКСПРЕССИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ У ПРЭСНОВОДНОГО МОЛЛЮСКА
*LYMNAEA STAGNALIS***

С.Н. Шевцова, А.С. Бабенко*, С.Е. Дромашко

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

Введение

Известно, что наряду с отходами нефтеперерабатывающей и нефтедобывающей промышленности, тяжелые металлы (ТМ) являются приоритетными поллютантами водной среды. Металлосодержащие сточные воды аграрно-промышленных комплексов, а также добывающих и перерабатывающих производственных предприятий – основные источники поступления ТМ в водоемы. В силу того, что антропогенная нагрузка на гидросферу в целом продолжает оставаться высокой, изучение, оценка и прогноз влияния различных загрязняющих веществ на компоненты водной биоты и здоровье человека является актуальным [1, 2].

Состояние пресноводных экосистем оценивается с применением многих компонентов макрозообентоса, в том числе и моллюсков. Высокая плотность природных популяций, особенности образа жизни (относительно низкая подвижность, питание преимущественно осадочным детритом и перифитоном) и простота сбора особей позволяют использовать брюхоногих моллюсков в практике как пассивного, так и активного биомониторинга [3–6]. Вместе с тем, уровни содержания тяжелых металлов и органических ксенобиотиков в различных тканях и органах этих беспозвоночных не всегда позволяют адекватно оценить степень загрязненности конкретного водного объекта или акватории. В частности, в силу существующих различий в особенностях обменных процессов даже у представителей одного и того же рода гидробионтов, биоаккумуляция ТМ характеризуется видовой и даже органной специфичностью. Например, по отношению к ионам кадмия чрезвычайно высокой накопительной способностью характеризуется большой прудовик (*Lymnaea stagnalis*), тогда как по отношению к меди, цинку и свинцу индикаторными видами пресноводных моллюсков являются *Planorbarius purpura*, *Viviparus viviparus* и *Unio rostratus*, соответственно [7].

С одной стороны, количественное определение содержания ТМ в теле гидробионтов позволяет оценить изменение в состоянии целостной гидроэкосистемы за достаточно продолжительный период времени, причем часто очень высокие уровни содержания данных токсикантов в тканях водных организмов регистрируются при концентрации их в воде ниже порога детекции. С другой стороны, как с научной точки зрения, так и в отношении практического применения, наиболее важна регистрация ранних изменений, происходящих в организме гидробионтов на молекулярно-генетическом и клеточном уровне при резком ухудшении качества водной среды. К наиболее репрезентативным маркерам загрязнения водной среды ТМ относят наличие внутриклеточных везикул с тяжелыми металлами, хромосомные aberrации, ДНК-разрывы, изменение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и др.), а также уровня экспрессии металлотioneинов (МТ) [8–12]. МТ – цистеинсодержащие низкомолекулярные белки, которые, помимо основной своей двоякой функции: создания депо эссенциальных элементов и защиты клетки от токсических эффектов избытка ТМ, выполняют также роль антиоксидантов, снижающих повреждающее действие свободных радикалов кислорода [13, 14].

Известно, что в случаях умеренного загрязнения поверхностных вод соединениями ТМ, уровень содержания МТ в теле многих видов водных беспозвоночных тесно коррелирует с концентрацией ряда ТМ в водной среде [15–17]. На данном основании уровень содержания

МТ у двустворчатых моллюсков и рыб рекомендуется использовать в качестве молекулярного биомаркера при проведении международных биомониторинговых программ [18]. Вместе с тем, за последнее десятилетие появился ряд публикаций, в которых обсуждается проблема адекватности трактовки данных, полученных в экотоксикологических исследованиях с применением МТ. Суть проблемы в том, что отсутствие выраженной зависимости между уровнем экспрессии/содержанием МТ в организме гидробионтов и концентрацией ТМ в водной среде может быть обусловлено индукцией синтеза данных белков под воздействием многих физических, химических и биологических факторов [19–21]. Кроме того, в силу различной чувствительности гидробионтов к воздействию ТМ, накопление МТ также характеризуется видовой и органной специфичностью [22].

В настоящее время на территории Беларуси, России и Украины в рамках мониторинговых программ проводится изучение и оценка воздействия химических загрязнителей антропогенной природы, поступающих в водоемы, на состояние гидросистем. При этом поиск наиболее чувствительных критериев оценки нарушения устойчивого равновесия водных сообществ с применением методов молекулярной биологии продолжает оставаться весьма актуальным. Проведение экотоксикологических исследований с применением *L. stagnalis* является весьма актуальным, так как данный вид вторичноводных моллюсков отнесен к объектам мониторинга состояния поверхностных вод Республики Беларусь. Кроме того, благодаря стабильно высокой численности природных популяций и простоте культивирования в лабораторных условиях, *L. stagnalis* представляет собой удобную и репрезентативную тест-систему для исследований в различных областях экспериментальной биологии.

Литературные данные свидетельствуют о том, что воздействие меди на развитие моллюсков изучено достаточно полно [23–26]. Особенности реагирования улиток на влияние солей меди в остром лабораторном эксперименте также посвящен ряд публикаций [27–30]. Вместе с тем, данные о длительном хроническом влиянии низких концентраций меди на рост и выживаемость большого прудовика практически отсутствуют. Кроме того, оценка содержания МТ в теле большого прудовика проводилась с применением лишь количественных методов анализа (судя по имеющимся на сегодняшний день литературным данным) [31]. Целью данной работы явилась оценка выживаемости и роста, а также изменения уровня экспрессии гена МТ в мягких тканях *L. stagnalis* в результате длительного воздействия сублетальных концентраций меди методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР в РРВ).

Разработка метода оценки состояния водной среды с применением ПЦР в РРВ на особях большого прудовика имеет не только существенную фундаментальную, но и практическую значимость. При наличии высокой корреляции между концентрацией ионов меди в водной среде и уровнем экспрессии металлопротеинов в теле *L. stagnalis* будет возможно рекомендовать данный показатель в качестве молекулярно-генетического маркера ухудшения качества водной среды наряду с другими чувствительными критериями.

Методы исследования

Оценка роста и выживаемости моллюсков в лабораторном эксперименте

В лабораторных условиях (на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси) было проведено два хронических эксперимента длительностью 100 и 70 суток.

В первом (100-суточном) опыте было задействовано 52 моллюска лабораторного разведения в возрасте 2-х с половиной месяцев. Выбор концентраций меди был основан на существующем значении ПДК [32]. Маточный раствор меди готовили путем растворения навески пятияводной серноокислой меди в дистиллированной воде. Рабочий раствор с заданными концентрациями испытуемого металла (0; 0,01; 0,1 и 0,5 мг/л или 0; 0,01; 0,1 и 0,5 ПДК, соответственно) перед началом опыта и при обновлении токсической среды готовили путем добавления необходимого объема маточного раствора в отстоявшуюся в течение суток водопроводную воду. Инкубационной средой для контрольной группы

служила отстоявшаяся в течение суток водопроводная вода. Перед началом экспозиции моллюски были рандомизированы по массе и распределены на 4 группы (по 13 особей в каждой) в соответствии с указанными концентрациями меди. В течение всего эксперимента улиток содержали в аквариумах емкостью 4 литра (из расчета не менее 1 л на особь) при естественном фотопериоде. Среднесуточная температура инкубационной среды составляла 20–23°C.

Второй эксперимент был представлен двумя параллельными повторностями, в каждой из которых была задействована одна кладка, полученная от перекрестного оплодотворения особей большого прудовика лабораторного разведения. Две практически одновременно отложенные кладки, содержащие капсулы с зародышами на стадии велигера, были аккуратно разрезаны скальпелем вдоль на 2 части, первая из которых служила контролем и инкубировалась в течение 70 суток в отстоянной водопроводной воде, а вторая – в водном растворе, содержащем 0,01 мг/мл меди. В течение всего периода эмбриогенеза инкубационную среду обновляли каждые вторые сутки, а после появления молоди моллюски аккуратно (с помощью кисточки) были рассажены в аквариумы емкостью 4 л из расчета не менее 1 л на особь. Среднесуточная температура инкубационной среды составляла 20–23°C.

В обоих экспериментах водную среду обновляли каждые вторые сутки, удаляя при этом остатки корма и тщательно промывая внутренние стенки аквариумов. Корм улиткам (свежие листья салата) задавали с избытком. Подсчет выживших особей и оценку сырой массы тела моллюсков проводили каждые 10–15 суток экспозиции. По окончании экспериментов каждую особь извлекали из инкубационной среды и погружали в жидкий азот. Образцы ткани *L. stagnalis* хранились при -20°C во фризере в течение 5 месяцев.

Выделение РНК и обратная транскрипция

Для проведения ПЦР в РРВ общую фракцию РНК извлекали из ноги моллюска. Всего был получен 31 образец РНК из 16 особей контроля и 15 особей, подверженных воздействию меди. Общую фракцию РНК выделяли с использованием набора реагентов «РНК-ВТК» (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) согласно протоколу производителя. Выбор органа-мишени был основан на литературных данных по органоспецифичности фоновых уровней содержания МТ у брюхоногих моллюсков [33]. Гомогенизацию ткани проводили в присутствии жидкого азота. С помощью скальпеля от замороженного моллюска отделяли образец ткани ноги весом около 100 мг, помещали в керамическую ступку и размельчали до однородного состояния. Вносили 1 мл «Раствора для гомогенизации», содержащего 2-меркаптоэтанол. Полученный гомогенат повторно измельчали и аликвотировали по пробиркам (1,5 мл). Хранили во фризере при -20°C. Оценка качества полученных образцов РНК проводили с помощью спектрофотометра «NanoDrop 2000» («Thermo», США).

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора «РЕВЕРТА» («Амплисенс», Россия). В состав набора входили случайные олигогексамеры и M-MLV обратная транскриптаза. Отжиг случайных олигогексамеров проводили при 70°C 5 мин, обратную транскрипцию при 37°C 30 мин. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, количество РНК на 1 реакцию – 0,1 мкг. После реакции к каждому полученному образцу кДНК добавляли 20 мкл ТЕ-буферного раствора. Образцы кДНК моллюсков хранили при -20°C в течение 5 месяцев.

Информация о генах

В виду того, что последовательность гена МТ *Lymanaea stagnalis* отсутствует в электронных базах данных «NCBI Gene» и «NCBI Nucleotide», при конструировании праймеров за основу была взята последовательность гена МТ пресноводного брюхоного моллюска *Physa acuta* (GenBank: GU259686.1). С помощью онлайн сервиса «NCBI Blast» была обнаружена последовательность кДНК гена МТ *Lymanaea stagnalis* на сравнительно небольшом участке (длинной 778 пар оснований), для которого отсутствовала подробная характеристика (GenBank: ES578255.1). С помощью программного обеспечения

VectorNTI v10.0.1 был проведен сравнительный анализ последовательностей кДНК обоих видов моллюсков и выбран участок с наибольшей степенью гомологии (90%), что позволило ограничить участок кДНК, вероятно, соответствующий гену МТ *Lymanaea stagnalis*.

Конструирование праймеров

Специфические олигонуклеотидные праймеры были выбраны с помощью программного пакета Vector NTI10.0.1 и программного обеспечения «Primer Express 3.0» («Applied Biosystems», США). При выборе олигонуклеотидов руководствовались тем, чтобы их размер не превышал 25 нуклеотидов, процентное содержание GC-нуклеотидов в праймере составляло примерно 50%, температура плавления праймеров отличалась менее чем на 5°C. Кроме того, избегали областей последовательности кДНК, которые богаты повторами типа XXXX, XYXYXY, следили, чтобы в 3'-концевой области олигонуклеотидного праймера не было dT (таблица 1).

Таблица 1 – Специфические олигонуклеотидные праймеры для ПЦР гена МТ *L. stagnalis*

№	Название	Последовательность	количество п.о.
1	Лим_1_Ф (прямой)	5-GAGGCCTGCACTGGCGAACAATG-3	23
2	Лим_1_Р (обратный)	5-GCTACCGGCATCACATTTGC-3	20

Анализ последовательности праймеров показал, что при температуре 60°C может образоваться 6 вариантов димеров, однако ни один не является стабильным при заданной температуре. Принимая во внимание тот факт, что по отдельности каждый праймер может образовывать стабильные димеры при 60°C, концентрации каждого из них при оптимизации ПЦР были увеличены. В свою очередь, анализ ампликона (123 пары оснований) показал, что при температуре 60°C возможно образование 9 стабильных димеров из 199 возможных и 1 стабильной шпильчатой структуры из 93 возможных, что не является критичным для проведения ПЦР.

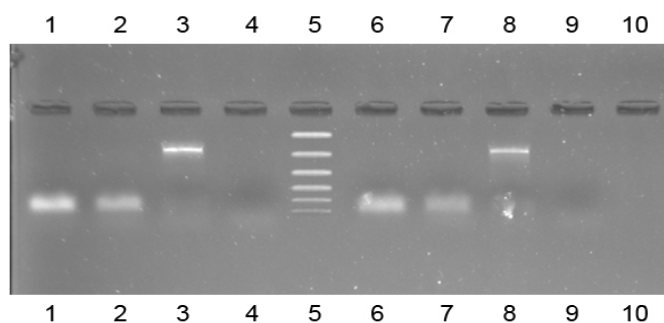
Оптимизация ПЦР и проведение ПЦР в РРВ

Классическую ПЦР проводили на градиентном амплификаторе PTC 3000 («Bio-Rad», США). ПЦР в РРВ проводили с помощью прибора ABI 7500 («Applied Biosystems», США). Условия термоциклирования при оптимизации: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин; 33 цикла амплификации: денатурация при 95°C в течение 15 сек, отжиг праймеров и синтез ДНК при (55–65°C) в течение 60 сек. Условия термоциклирования при ПЦР в РРВ: первичная денатурация при +95°C в течение 5 мин; 45 циклов амплификации: денатурация при +95°C в течение 10 сек, отжиг праймеров и синтез ДНК при +60°C в течение 60 сек. Для детекции накопления продуктов ПЦР в РРВ использовали интеркалирующий краситель SYBR Green I («Bio-Rad», США). Измерение флуоресценции образца проводили в конце каждого цикла амплификации по каналу FAM/Sybr. Объем реакционной смеси составил 25 мкл (3 мкл образца/контроля и 22 мкл ПЦР смеси). Концентрация каждого специфического олигонуклеотидного праймера 500 нМ, ионов Mg²⁺ 2,0 мМ, каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов 0,2 мМ. Использовали 1,25 МЕ на реакцию термостабильной Taq ДНК-полимеразы в смеси с 0,25 ед. термостабильной Pfu ДНК-полимеразой (Институт биоорганической химии НАН Беларуси). Буферный раствор для амплификации содержал 50 мМ KCl, 600 мМ Трис–HCl pH 9,0, 170 мМ (NH₄)₂SO₄ и 0,1% Tween-20. Для постановки ПЦР использовали лабораторный пластик: наконечники, пробирки, штативы, 96- и 48-луночные планшеты («Ахуген», США).

Разделение продуктов ПЦР в агарозном геле

Полученные фрагменты ДНК визуализировали с помощью гель-электрофореза в 2% агарозе («Диам», Россия), содержание бромистого этидия составляло 2,5 мкг/мл (рисунок 1). К 25 мкл раствора, содержащего кДНК моллюска и ампликон, добавляли 5 мкл буферного раствора для внесения в гель: глицерин 50%, бромфеноловый синий 0,01% и ЭДТА 250 мМ,

pH 8,0. Буферный раствор для внесения в гель готовили с применением ингредиентов производства «Sigma» (США)



1, 2 – нога; 3 – положительный контроль (ДНК человека с праймерами к участку, соответствующему последовательности гена *GAPDH*); 4 – отрицательный контроль (дист. вода в качестве матрицы); 5 – стандарты молекулярной массы; 6, 7 – нога; 8 – положительный контроль; 9 – отрицательный контроль

Рисунок 1 – Результаты амплификации образцов кДНК *L. stagnalis*

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных было использовано программное обеспечение «STATISTICA 6.0». После проверки всех выборок на нормальность с помощью критерия Шапиро-Уилкса статистическая значимость различий между контролем («0 ПДК Cu») и опытом («0,01 ПДК Cu») была оценена по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным, наивысшие из заданных концентраций меди (0,1 и 0,5 мг/л) оказали летальный эффект на особей *L. stagnalis*: все моллюски из групп «0,1 ПДК Cu» и «0,5 ПДК Cu» погибли к окончанию первых и пятых суток экспозиции, соответственно (рисунок 2А).

В первом эксперименте в течение первых 60 суток экспозиции медь в концентрации 0,01 мг/л не оказала выраженного угнетающего эффекта на жизнедеятельность испытуемых моллюсков, которые интенсивно росли и размножались. Однако далее, начиная с 70-х суток, было отмечено достоверное возрастание смертности улиток в группе «0,01 ПДК Cu». При этом в период с 70-х суток до окончания опыта выживали наиболее крупные улитки из группы «0,01 ПДК Cu» (рисунок 2А). Это дает основание предполагать, что крупные особи моллюсков характеризуются несколько более высокой степенью токсикорезистентности по отношению к меди в силу меньшей площади поверхности тела (по отношению к его объему), контактирующей с токсичной средой, а также полному развитию механизмов детоксификации и регуляции ионного обмена. В то же время, для обеих повторностей 70-суточного эксперимента было установлено, что на протяжении всего экспозиционного периода моллюски из групп «0,01 ПДК Cu» существенно отставали в росте по сравнению с контролем ($p < 0,001$) (рисунок 2Г, Е). Начиная с третьего месяца экспозиции в опытных группах «0,01 ПДК Cu» было отмечено достоверное возрастание смертности (рисунок 2В, Д). Таким образом, очевидно, что в наибольшей степени токсический эффект сульфата меди проявился именно во втором эксперименте, где начало экспозиционного периода приходилось на вторую половину эмбриогенеза и раннего развития выклюнувшейся молоди. Это свидетельствует о значительно более высокой степени чувствительности к воздействию меди эмбрионов и ювенильных особей большого прудовика по сравнению со взрослыми моллюсками.

Полученные нами результаты вполне согласуются с литературными данными, так как более высокая степень уязвимости организма именно на ранних этапах онтогенеза к

действию различных стрессорных факторов была доказана рядом работ на различных видах позвоночных и беспозвоночных организмов [34, 35].

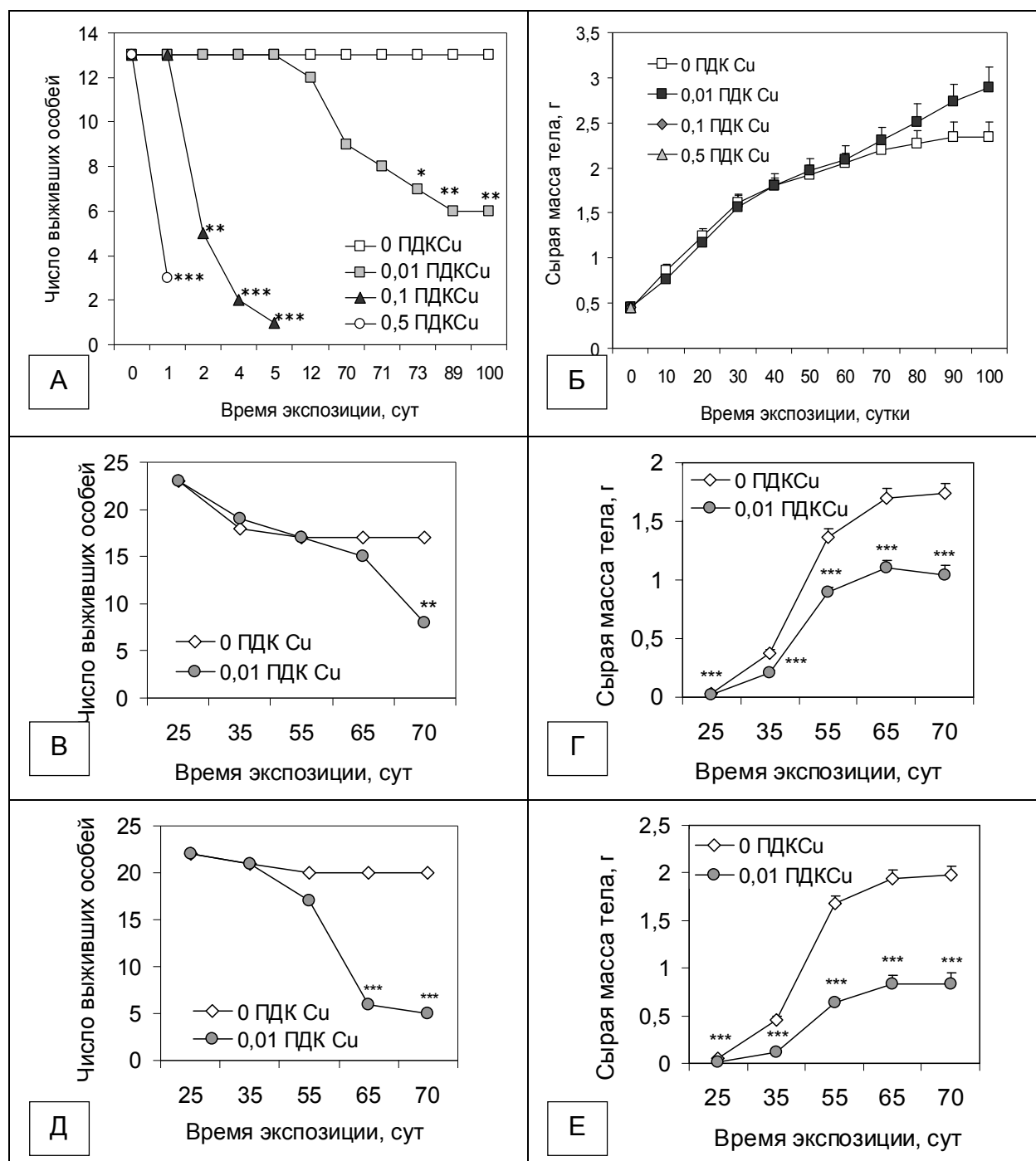


Рисунок 2 – Изменение выживаемости (А, В, Д) и сырой массы тела (Б, Г, Е) особей *L. stagnalis*, содержащихся в водном растворе сульфата меди

Примечание. Относительные величины приведены как средние значения со стандартными ошибками. Достоверность различий с контролем по критерию Стьюдента: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$.

В целом, в литературе достаточно широко представлены данные, свидетельствующие о выраженном токсическом действии солей меди на скорость развития, рост и выживаемость моллюсков различных видов [36–38]. В свете этого, полученные нами результаты оценки

роста и выживаемости большого прудовика в условиях хронического влияния сульфата меди подтверждают данные других авторов.

Результаты оценки уровня экспрессии гена МТ большого прудовика методом ПЦР в РРВ не выявили достоверных различий между опытными и контрольными группами обоих экспериментов, исходя из уровня содержания мРНК в ноге моллюсков (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты оценки уровня экспрессии гена МТ *L. stagnalis* методом ПЦР в РРВ

Эксперимент 1 (длительность 100 сут)		
Концентрация меди в среде, мг/л	Значения C_p	
	М	$\pm SE$
0 (контроль)	17,82	0,51
0,01	17,21	0,51
Эксперимент 2 (длительность 70 сут)		
повторность 1		
0 (контроль)	21,8	0,52
0,01	20,11	0,84
повторность 2		
0 (контроль)	21,31	0,34
0,01	20,19	0,51

Примечание. C_p – номер цикла амплификации, на котором уровень флуоресценции пересёк пороговую линию. Относительные величины приведены как средние значения (М) со стандартными ошибками ($\pm SE$).

В целом, уровень содержания в клетке МТ определяется скоростью двух процессов: экспрессии гена, следствием которой в норме является индукция синтеза белка, и деструкции МТ под действием металлопротеиназ [39]. Очевидно, длительная интоксикация медью вызвала выраженные нарушения водно-солевого обмена и дисбаланс метаболизма в организме большого прудовика: об этом свидетельствует достоверное снижение выживаемости моллюсков из опытных групп после 70 и 60 суток экспозиции в первой и второй повторности 70-суточного эксперимента (рисунок 2В, Д).

Опираясь на полученные нами результаты и данные других исследователей [40], можно предположить, что к окончанию 100-суточного эксперимента у особей *L. stagnalis* из группы «0,01 ПДК Си» произошло изменение соотношения процессов синтеза и деструкции молекул МТ в сторону деградациии на фоне общего нарушения водно-солевого обмена в условиях медной интоксикации. В пользу данного предположения свидетельствует прогрессирующая гибель наиболее мелких особей из группы «0,01 ПДК Си» первого опыта (рисунок 2Б, рисунок 3), которые, по-видимому, в силу некоторых анатомо-физиологических особенностей (относительно меньшего отношения объема к площади поверхности тела и др.) оказались менее устойчивы к действию испытываемого токсиканта.

В обеих повторностях второго эксперимента токсическое действие меди было выражено значительно острее, результатом чего, по-видимому, явилось угнетение не только ионного обмена, необходимого для процессов роста и развития, но и ряда других метаболических процессов, включая белоксинтезирующую функцию. Так, в мировой литературе широко распространено мнение, согласно которому в условиях воздействия высоких концентраций некоторых ТМ в организме моллюсков происходит подавление реализации механизмов детоксификации: на фоне интенсивного внутриклеточного депонирования ТМ в составе мембранных везикул не происходит синтеза дополнительного пула молекул МТ. Кроме того, сравнительно недавно было установлено, что в условиях экстремального повышения концентраций ТМ в водной среде, содержание данных поллютантов в мягких тканях большого прудовика перестает возрастать [41].

Согласно литературным данным, наибольшей способностью индуцировать синтез МТ обладают кадмий и медь [42–45]. Кроме того, была установлена способность кадмия повышать скорость накопления некоторых других ТМ (никеля, хрома, свинца и цинка) в

тканях *L. stagnalis* [46], что, по мнению авторов указанной публикации, связано с возрастанием содержания МТ, хелатирующих металлы в теле моллюсков.

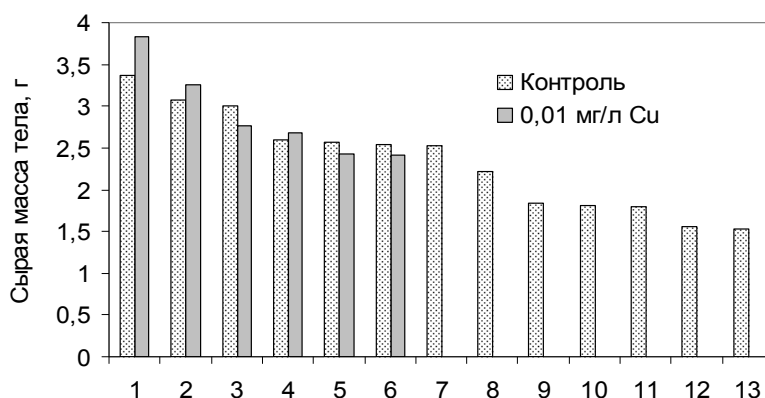


Рисунок 3 – Сырая масса тела моллюсков из контрольной и опытной группы по окончании 100-суточной экспозиции

Примечание. На графике представлены значения сырой массы тела только для шести особей из группы «0,01 ПДК Cu», так как остальные моллюски более мелкого размера не выжили к окончанию данного эксперимента.

Однако, поскольку количественного анализа уровня содержания меди в тканях экспериментальных животных проведено не было, выдвинутое нами предположение является гипотетичным и не может быть положено в основу строгого вывода о причине отмеченного нами отсутствия достоверных различий по уровню экспрессии гена МТ у особей *L. stagnalis* из контрольных и опытных групп. Заметим также, что примененные нами методы молекулярной биологии обеспечивают детекцию лишь весьма существенных различий в уровне экспрессии гена, поэтому для получения более точной информации необходимы дальнейшие исследования с использованием флуоресцентных зондов, а также проведение секвенирования гена/генов МТ большого прудовика.

Выводы

Результаты наших исследований свидетельствуют о выраженном и достоверном токсическом эффекте всех заданных концентраций меди (от 0,01 до 0,5 мг/л) на выживаемость большого прудовика. При действии меди в концентрации, соответствующей 0,5 ПДК, была зарегистрирована 100% смертность моллюсков в течение первых 12 ч, тогда как достоверное возрастание смертности большого прудовика в условиях влияния 0,01 ПДК данного металла было отмечено только в начале третьего месяца экспозиции. Очевидно, что адекватная оценка моллюскицидного эффекта низких (менее 0,01 ПДК) концентраций меди требует постановки длительного хронического эксперимента. Показано, что улитки на ранних этапах онтогенеза отличаются значительно более высокой степенью чувствительности к действию меди по сравнению со взрослыми особями.

Проведенные исследования позволили оптимизировать метод выделения общей фракции РНК из тканевого гомогената *L. stagnalis*, сконструировать специфические олигонуклеотидные праймеры для амплификации кДНК гена МТ моллюсков данного вида, а также оптимизировать условия амплификации. Достоверные различия по уровню экспрессии гена МТ в ноге моллюсков из контрольных и опытных групп не установлены. Для верификации полученных результатов необходима постановка дополнительных опытов с меньшей продолжительностью экспозиционного периода, а также проведение исследований с привлечением более точных и чувствительных методов молекулярной биологии (ПЦР в РРВ с использованием TaqMan зондов).

В целом, полученные результаты могут найти применение при проведении мониторинговых исследований поверхностных вод, а также в практике лабораторного биотестирования металлосодержащих отходов.

Список литературы

1. Adverse reproductive and child health outcomes among people living near highly toxic waste water drains in Punjab, India / J.S. Thakur [et al.] // *J Epidemiol Community Health* – 2010. – Vol. 64, № 2. – P. 148–154.
2. Jarup, L. Hazards of heavy metal contamination / L. Jarup // *British Medical Bulletin*. – 2003. – Vol. 68. – P. 167–182.
3. Бабуева, Р.В. Брюхоногие моллюски (Gastropoda) верхней Оби и Обь-Иртышского междуречья, их роль в биоиндикации вод / Р.В. Бабуева // Проблемы устойчивого развития Обь-Иртышского бассейна. – Новосибирск: Наука, 2005. – С. 116–118.
4. Molluscs in biological monitoring of water quality / J. Salánki [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2003. – Vol. 140–141. – P. 403–410.
5. El Gawad, S. The mollusk gastropod *Lanistes carinatus* (Olivier, 1804) as a biomonitor for some trace metals in the Nile river / S. El Gawad // *Internation J Zool Res.* – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 115–125.
6. Брень, Н.В. Биологический мониторинг и общие закономерности накопления тяжёлых металлов пресноводными донными беспозвоночными загрязнение водных экосистем тяжёлыми металлами / Н.В. Брень // *Гидробиол. журн.* – 2008. – Т. 44, № 2. – С. 96–115.
7. Киричук, Г.Е. Особенности накопления ионов тяжёлых металлов в организме пресноводных моллюсков / Г.Е. Киричук // *Гидробиол. журн.* – 2006. – Т. 42, № 4. – С. 99–110.
8. Rogevich, E.C. Effects of sublethal chronic copper exposure on the growth and reproductive success of the Florida apple snail (*Pomacea paludosa*) / E.C. Rogevich, T.C. Hoang, G.M. Rand // *Arch Environ Contam Toxicol.* – 2009. – Vol. 56, № 3. – P. 450–458.
9. Zhu, Liyan Using DNA damage to monitor water environment / Liyan Zhu, Ying Huang, Guangxing Liu // *Chinese J Ocean Limnol.* – 2005. – Vol. 23, № 3. – P. 340–348.
10. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (Spain) / L. Vidal-Liñán [et al.] // *Chemosphere.* – 2010. – Vol. 78, № 3. – P. 256–272.
11. Smaoui-Damak, W. In situ potential use of metallothionein as a biomarker of cadmium contamination in *Ruditapes decussates* / W. Smaoui-Damak, B. Berthet, A. Hamza-Chaffai // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2009. – Vol. 72, № 5. – P. 1489–1498.
12. Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae / A. Geffard [et al.] // *Arch Environ Contam Toxicol.* – 2007. – Vol. 53. – P. 57–65.
13. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis* / A. Viarengo [et al.] // *Am J Physiol.* – 1999. – Vol. 227. – P. R1612–R1619.
14. Oxidative burst and metallothionein as a scavenger in macrophages / P. Irato [et al.] // *Immunol Cell Biol.* – 2001. – Vol. 79. – P. 251–254.
15. Roesijadi G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals / G. Roesijadi // *Aquatic Toxicol.* – 1992. – Vol. 22. – P. 81–114.
16. Viarengo, A. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes / A. Viarengo, B. Burlando // *Biomarkers.* – 1999. – Vol. 6. – P. 455–466.
17. A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality / A. Cravo [et al.] // *J Environ Monit.* – 2009. – Vol. 11, № 9. – P. 1673–1686.
18. Report on the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC), 2003. Report number: ICES CM 2003/E:06, Ref. ACME. Copenhagen: International Council for the Exploration of the sea (ICES). 58 P.

19. English, T.E. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea* / T.E. English, K.B. Storey // J Exp Biol. – 2003. – Vol. 206, Pt 14. – P. 2517–2524.
20. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers / C. Amiard [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2006. – Vol. 76. – P. 160–202.
21. Стручкова, И.В. Регуляция биосинтеза белка: Учебно-методическое пособие / И.В. Стручкова, А.А. Брилкина, А.П. Веселов / – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2010. – 100 с.
22. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury / M. Baudrimont [et al.] // Environ Toxicol Chem. – 1997. – Vol. 16. – P. 2096–2105.
23. Sensitivity of embryotoxicity test with *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) towards some compounds of environmental interest (copper and pesticides) / C. Losso [et al.] // Environ. Tech. – 2004. – Vol. 25, № 7. – P. 841–846.
24. Ярославцева, Л.М. Влияние ионов меди на ранние стадии развития тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* (Bivalvia) / Л.М. Ярославцева, Э.П. Сергеева // Биология моря. – 2005. – Т. 31, № 4. – С. 267–273.
25. Khangarot, B.S. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. / B.S. Khangarot., S. Das // J Hazard Mat. – 2010. – Vol. 179. – P. 665–675.
26. Шевцова, С.Н. Влияние сульфата меди на эмбриональное развитие большого прудовика (*Lymnaea stagnalis*) / С.Н. Шевцова, В.Ю. Афонин, С.Е. Дромашко // Весці НАН Беларусі. Сер. Біял. навук. – 2011. – № 3. – С. 34–40.
27. Mathur, S. Acute toxicity of mercury, copper and zinc to a freshwater pulmonate snail, *Lymnaea luteola* (Lamarck) / S. Mathur, B.S. Khangarot, V.S. Durve // Acta Hydrochim Hydrobiol. – 1981. – Vol. 9. – P. 381–389.
28. Brix, K.V. The temperature dependence of the acute toxicity of copper to a freshwater pond snail, *Viviparus bengalensis* L. / K.V. Brix, A.J. Esbaugh, M. Grosell // Hydrobiologia. – 1981. – Vol. 83. – P. 461–464.
29. Brix, K.V. The toxicity and physiological effects of copper on the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis* / K.V Brix, A.J. Esbaugh, M. Grosell // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. – 2011. – Vol. 154, № 3. – P. 261–267.
30. Вискушенко, Д.А. Вплив сульфату міді на водний баланс *Lymnaea stagnalis* / Д.А. Вискушенко, Т.М. Павельчук, О.Д. Шимкович // Вісник Житомирського педагогічного університету. – 2002. – Вип. 10. – С. 166–169.
31. Ротт, Г.М. Содержание металлотионеинов у пресноводных моллюсков, обитающих в водоемах средней полосы России / Г.М. Ротт, В.А. Романцова, Б.И. Сынзыныс // Экология. – 1999. – № 4. – С. 306–308.
32. Гигиенические нормативы 2.1.5.10-21-2003: Сб. гигиенических нормативов по разделу коммунальной гигиены. – Мн., 2004. – С. 38–75.
33. Bebianno, M.J. Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea* / M.J. Bebianno, W.J. Langston // Talanta. – 1998. – Vol. 46. – P. 301–313.
34. Защита наследственных структур от хиноновых ксенобиотиков на основе модификаторов метаболической активации / С.Е. Дромашко [и др.] // Экологический вестник. – 2008. – № 2 (5). – С. 133–143.
35. Estebenet, A.L. Effect of short-term exposure to copper on survival of an apple-snails in an integrated control program / A.L. Estebenet, N.G. Cazzaniga // J Aquat Plant Manage. – 1990. – Vol. 28. – P. 103–105.
36. Вискушенко, Д.А. Реагирование прудовика озерного (*Lymnaea stagnalis* L.) на воздействие сульфата меди и хлорида цинка / Д.А. Вискушенко // Гидробиол. журн. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 86–92.

37. Copper toxicity to larval stages of three marine invertebrates and copper complexation capacity in San Diego Bay, California / I. Rivera-Duarte [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – Vol. 39, № 6. – P. 1542–1546.
38. Copper desorption in flooded agricultural soils and toxicity to the Florida apple snail (*Pomacea paludosa*): implications in Everglades restoration / T.C. Hoang [et al.] // *Environ Pollut.* – 2008. – Vol. 154, № 2. – P. 338–347.
39. Davis, S.R. Metallothionein Expression in Animals: a physiological perspective on function / S.R. Davis, R.J. Cousins // *J Nutr.* – 2000. – Vol. 130. – P. 1085–1088.
40. Metallothioneins and trace metals in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) collected from Icelandic coasts / K.M. Leung [et al.] // *Mar Pollut Bull.* – 2005. – Vol. 51, № 8–12. – P. 729–737.
41. Богатов, В.В. Аккумуляция тяжелых металлов пресноводными гидробионтами в горнорудном районе юга Дальнего востока России / В.В. Богатов, Л.В. Богатова // *Экология.* – 2009. – № 3. – С. 202–208.
42. Bebianno, M.J. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* / M.J. Bebianno, W.J. Langston // *Comp Biochem Physiol.* – 1992. – Vol. 103C. – P. 79–85.
43. Bebianno, M.J. Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussate* / M.J. Bebianno, M.A. Serafim, M.F. Rita // *Bull Environ Contam Toxicol.* – 1994. – Vol. 53. – P. 726–732.
44. Marie, V. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient / V. Marie, M. Baudrimont, A. Boudou // *Chemosphere.* – 2006. – Vol. 65, № 4. – P. 609–617.
45. Effect of cadmium chloride on metallothionein levels in carp / J. Kovarova [et al.] // *Sensors.* – 2009. – Vol. 9. – P. 4789–4803.
46. Concentrations of metallothionein-like proteins and heavy metals in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* exposed to different levels of waterborne cadmium / K.M. Leung [et al.] // *Bull Environ Contam Toxicol.* – 2003. – Vol. 71, № 5. – P. 1084–1090.

COPPER SULFATE IMPACTS ON GROWTH, SURVIVAL AND METALLOTHIONEIN EXPRESSION IN FRESHWATER POND SNAIL *LYMNAEA STAGNALIS*

S.N. Shevtsova, A.S. Babenko*, S.E. Dromashko

Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus

**Institute of bioorganics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

We studied Cu impacts on growth and survival as well as metallothionein expression in freshwater pond snails *Lymnaea stagnalis* exposed to increasing Cu concentrations (0; 0,01; 0,1 and 0,5 mg/l) using a **real-time PCR method**. Adult specimens of *L. stagnalis* were treated with Cu for 100 days in the first experiment, while embryos were exposed 60 d in the second one under laboratory conditions. Dose-dependent responses were obtained for growth and survival for the second experiment, while, due to the higher sensitivity of the juvenile specimens as compared with adult snails, just significant survival inhibition was revealed for the first one. Our results did not show any significant difference between Cu-treated and non-treated pond snails according to such endpoint as metallothionein expression in both experiments. Nevertheless, obtained data suggest that *L. stagnalis* can be used for freshwater risk assessment and toxicological biotests.