

ДРОМАШКО С.Е.^{1✉}, ШЕВЦОВА С.Н.¹, БАБЕНКО А.С.²¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: S.Dromashko@igc.by

² РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова

Беларусь, 223040, Минский р-н, а/з Лесной

✉ S.Dromashko@igc.by, +375 (17) 284-21-90, +375 (29) 666-69-34

ВОЗДЕЙСТВИЕ СВИНЦА И КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ ОСОБЕЙ *LYMNAEA STAGNALIS* L.

Наряду со стойкими органическими загрязнителями, тяжелые металлы также относят к консервативным поллютантам водной среды. Поступая в водоемы в составе промышленных отходов, атмосферных осадков, а также вместе с поверхностным стоком с территорий складирования отходов производства и потребления, тяжелые металлы способны накапливаться в водных организмах и губительно влиять на устойчивое существование гидроекосистем [1].

В настоящее время поиск репрезентативных молекулярных биомаркеров снижения качества водной среды и нарушения функционирования гидроекосистем не теряет актуальности. Брюхоногие моллюски представляют собой репрезентативную и экономически выгодную тест-систему для проведения биомониторинга и биотестирования. Например, такие представители класса Gastropoda, как *Lymnaea stagnalis* и *Potamopyrgus antipodarum* были рекомендованы Организацией экономического сотрудничества и развития для биотестирования веществ на предмет гормональной активности [2, 3]. Перспективность применения вторичноводного моллюска большого прудовика (*Lymnaea stagnalis* Linnaeus, 1758) в качестве тест-системы для экологических и токсикологических исследований обусловлена также простотой разведения и поддержания лабораторной культуры гидробионтов данного вида [4, 5]. В частности, исследовано воздействие таких тяжелых металлов, как кадмий, свинец, никель, медь и кобальт на зародышевое развитие и начальные стадии жизненного цикла большого прудовика [6–8].

Одним из биомаркеров, используемых при оценке качества водной среды, является уровень экспрессии мРНК ряда так называемых «стрессорных» генов, ответственных за раннее реагирование организма на неблагоприятные изменения в водной среде. Наряду с белками

теплового шока и ферментами антиоксидантной защиты, низкомолекулярные белки металлотиионеины (МТ) также ответственны за реализацию детоксификационных механизмов в условиях поступления в организм значительных количеств тяжелых металлов. Согласно литературным данным, у гастропод различные изоформы МТ обеспечивают избирательную защиту организма от негативных последствий токсических эффектов кадмия, меди и цинка [9]. Вместе с тем на сегодняшний день отсутствуют данные о характере воздействия соединений свинца на экспрессию известных у гидробионтов изоформ МТ.

Несмотря на более высокую чувствительность двустворчатых моллюсков по сравнению с брюхоногими к воздействию химических загрязнителей, создание и поддержание лабораторной культуры бивальвий намного сложнее в методическом плане и менее выгодно в отношении финансовых затрат по сравнению с таковой для гастропод, например, для *Lymnaea stagnalis*.

В свете этого целью настоящей работы явилась оценка применимости относительного уровня экспрессии мРНК гена МТ у половозрелых особей *Lymnaea stagnalis* лабораторного разведения в качестве биомаркера токсического влияния солей свинца и кадмия в субхроническом эксперименте.

Материалы и методы

Реагенты. В качестве источника ионов свинца и кадмия в экспериментах использовали $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ (свинца ацетат тригидрат) и $Cd(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ (кадмия ацетат дигидрат) с маркировкой «Ч». Расчетные концентрации ионов металлов получали путем растворения навески соли в водопроводной воде. Выбор диапазона заданных концентраций был основан на результатах предварительных пилотных экспериментов, а также на значениях предельно-

допустимых концентраций (ПДК), установленных для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения [10]. В обоих экспериментах с ацетатом свинца заданные концентрации ионов тяжелого металла составляли 0,003 и 0,03 мг/л; в опыте с ацетатом кадмия – 0,0001 и 0,001 мг/л. Инкубационной средой для моллюсков из контрольной группы во всех экспериментах служила отстоявшаяся водопроводная вода.

Условия проведения экспериментов на особях L. stagnalis.

1. В 7-суточной экспозиции с ацетатом свинца (эксперимент 1) были задействованы половозрелые особи большого прудовика лабораторного разведения в возрасте 4 месяцев. Предварительно рандомизированных по массе моллюсков распределяли на три группы – контрольную, которую далее инкубировали в водопроводной воде без добавления соли свинца, и две опытные, которые инкубировались в условиях воздействия 0,003 и 0,03 мг/л Pb^{2+} соответственно.

2. В эксперименте 2 были задействованы половозрелые особи большого прудовика лабораторного разведения в возрасте 7,5 месяца. Предварительно рандомизированных по массе моллюсков распределяли на три группы – контрольную, которую далее инкубировали в водопроводной воде без добавления соли свинца, и две опытные, которые инкубировались в условиях воздействия 0,003 и 0,03 мг/л Pb^{2+} соответственно. По окончании 7-х суток инкубации 50 % особей из каждой группы (контрольной и двух опытных) изымали для проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований, а остальных моллюсков инкубировали в заданных экспериментальных условиях еще 7 суток, так что для них общая длительность экспозиции составила 14 суток.

3. В эксперименте 3 с ацетатом кадмия использовали половозрелых моллюсков лабораторного разведения в возрасте 7,5 месяца. Схема его проведения полностью повторяет такую для эксперимента 2. Заданные концентрации ионов кадмия составляли 0,0001 и 0,001 мг/л.

Во всех экспериментах экспозицию проводили в стандартизированных условиях. В течение экспозиции плотность посадки взрослых моллюсков была фиксированной: 1 особь/0,5 л водной среды. Водную среду обновляли каждые вторые сутки, моллюсков кормили листьями

салата с избытком. По окончании экспозиции моллюсков индивидуально взвешивали, предварительно обсушив на фильтровальной бумаге. Далее каждую особь погружали в жидкий азот, извлекали из него и помещали на хранение в низкотемпературную камеру ($-70^{\circ}C$), где хранили не более чем 3 месяца до проведения процедуры выделения РНК.

Выделение РНК и получение кДНК. Общую фракцию РНК выделяли индивидуально из гепатопанкреаса каждой взрослой особи *L. stagnalis*. Для выделения общей фракции РНК из тканей взрослых моллюсков у каждого отдельно взятого замороженного моллюска с помощью скальпеля отсекали фрагмент весом около 100 мг, состоящий из нескольких (2–3) концевых завитков раковины, покрывающих гепатопанкреас. Фрагмент гепатопанкреаса каждой экспериментальной особи механически гомогенизировали пестиком в керамической ступке в присутствии жидкого азота и 1 мл «Раствора для гомогенизации» (компонент набора для выделения РНК «РНК-ВТК», (ИБОХ, Беларусь), содержащий 2-меркаптоэтанол), измельчая до максимально однородной консистенции. Гомогенат, полученный из каждого образца ткани, аликвотировали по 2 пробиркам типа «эппендорф» емкостью 1,5 мл и хранили в низкотемпературной камере ($-70^{\circ}C$) не более 1 месяца.

Непосредственно перед выделением общей фракции РНК замороженные образцы гомогената гепатопанкреаса размораживали при комнатной температуре. Далее из каждого образца гомогената отбирали аликвоту (50 мкл) и проводили процедуру выделения общей фракции РНК с применением набора реагентов «РНК-ВТК» (ИБОХ НАН Беларуси, Беларусь) согласно протоколу производителя.

Оценку качества полученных образцов РНК проводили с помощью спектрофотометра «NanoDrop 2000» («Thermo», USA) посредством оценки спектра поглощения 220–320 нм. Целостность полученной РНК оценивали с помощью агарозного гель-электрофореза без использования денатурирующих условий. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора «РЕВЕРТА» («Амплиценс», Россия) согласно протоколу производителя. Образцы кДНК моллюсков хранили в морозильной камере ($-20^{\circ}C$) не более 1 месяца.

Дизайн олигонуклеотидов. Для конструирования специфических олигонуклеотидных

праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для ПЦР в режиме реального времени использовали депонированную нами ранее последовательность кДНК гена металлотиионеина GenBank: KT253648.1. [11, 12]. В качестве референсного гена использовали LPC2 (molluscan putative prohormone convertase) – GenBank X68850.1.

Дизайн праймеров осуществляли с использованием бесплатного программного онлайн приложения Primer3 v. 0.4.0 [13] и бесплатного онлайн алгоритма mfold/DNAfold [14]. Для анализа вероятности образования вторичных шпильчатых структур и димеров олигонуклеотидов использовали бесплатное онлайн обеспечение OligoAnalyzer 3.1 [15] и демонстрационную версию коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 [16].

Последовательности выбранных олигонуклеотидов:

MT_Forward_5-CAATTGTGGTGACAGC
TGTAAG-3;

MT_Reverse_5-GCTGAACATTTGCATGT
CTTG-3;

MT_Probe_5-(FAM)-TGGTGAGGGTCGC
AACTGCCCAAGC-(BHQ1)-3;

LPC2_Forward_5-TGCTACACGGAACAA
AGACG-3;

LPC2_Reverse_5-CGTGGGACCACTACTC
CTGT-3;

LPC2_Probe_5-(FAM)-AGAGCGTCACGA
GAAGCTGTAAGT-(BHQ1).

Оценка уровня экспрессии гена MT у L. stagnalis. Оценку уровня экспрессии проводили методом ПЦР в режиме реального времени отдельно для целевого и референсного генов на приборе «CFX96Touch» («Bio Rad», США). Детекцию проводили в конце каждого цикла амплификации по каналу FAM. Состав реакционной смеси на 1 реакцию, объем 25 мкл: концентрация ионов магния – 2 мМ, концентрация дезоксинуклеотидтрифосфатов – 0,1 мМ, концентрации олигонуклеотидов в равных соотношениях – 500 нМ каждого, количество единиц активности термостабильной полимеразы – 1,25, количество кДНК на реакцию порядка 250 нг. Для приготовления реакционной смеси использовали реагенты отечественного производства («Праймтех», Беларусь). Уровень экспрессии гена MT оценивали по результатам проведенных реакций с использованием программного приложения «REST 2009» (M. Pfaffl – Technical University Munich и QIAGEN, США).

Результаты и обсуждение

По итогам экспериментов 1 и 2 на 7-е сутки воздействия 0,003 мг/л ионов свинца было установлено значительное возрастание уровня экспрессии мРНК гена MT как у молодых (4,5 месяца), так и у более старых (7 месяцев) особей большого прудовика по сравнению с соответствующим показателем у особей контрольной группы (табл. 1). Более высокая концентрация свинца (0,03 мг/л) оказала значительное воздействие на уровень экспрессии мРНК гена MT только у более молодых моллюсков по окончании 7-х суток инкубации (табл. 1).

В результате воздействия 0,0001 мг/л ионов кадмия на 7-е сутки в эксперименте 3 было отмечено возрастание уровня экспрессии мРНК гена MT более чем в 3 раза; при воздействии 0,001 мг/л кадмия – более чем в 6 раз относительно соответствующего показателя у моллюсков контрольной группы (табл. 2).

Характерно, что по окончании 14-суточного влияния всех заданных концентраций как свинца (эксперимент 2), так и кадмия (эксперимент 3) не было зафиксировано значительных изменений в уровне экспрессии мРНК гена MT у моллюсков в возрасте 7,5 месяца по сравнению с соответствующими показателями для моллюсков из контрольных групп (табл. 1, 2).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о существенном влиянии как продолжительности экспозиции с токсикантом, так и возраста экспонируемых моллюсков на быстроту (время отклика), регистрируемого с помощью такого биомаркера, как уровень генной экспрессии.

Очевидно, свинец в концентрации 0,003 мг/л и выше оказывает выраженное активирующее воздействие на механизмы экспрессии мРНК гена MT у половозрелых особей большого прудовика, что может быть зафиксировано в краткосрочном эксперименте длительностью не более 7 суток, поскольку выбранный нами маркер стрессорного воздействия характеризуется ранним откликом. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что возраст задействованных в эксперименте моллюсков также имеет значение: оптимальным возрастным диапазоном для применения у особей *L. stagnalis* лабораторного разведения молекулярных маркеров неблагополучия водной среды у пресноводных гастропод, по-видимому, является 3–5 месяцев. По-видимому, у начи-

нающих стареть половозрелых особей большого прудовика (в возрасте старше 7 месяцев) успешность реализации механизмов детоксикации, одним из которых является индукция экспрессии стрессорных генов, уступает таковой у более молодых животных, достигших половой зрелости. Возможно, одной из основных при-

чин существенного различия в степени возрастания уровня генной экспрессии МТ при влиянии 0,003 и 0,03 мг/л ионов свинца у моллюсков из эксперимента 1 (4 месяца) и моллюсков из эксперимента 2 (7,5 месяца) явился именно этот фактор.

Таблица 1. Влияние свинца на уровень экспрессии мРНК гена МТ у *L. stagnalis* в субхроническом эксперименте

Концентрация Pb^{2+} , мг/л	Кратность ПДК [10]	Кратность повышения уровня экспрессии гена МТ относительно контроля	Кол-во особей в группе
7 суток (эксперимент 1)			
0,003	0,1	117,4**	11
0,03	1	71,2*	12
7 суток (эксперимент 2)			
0,003	0,1	6,8***	8
0,03	1	-	8
14 суток (эксперимент 2)			
0,003	0,1	-	10
0,03	1	-	10

Примечания: различия с контролем (уровнем генной экспрессии у моллюсков контрольной группы) считали значимыми: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Таблица 2. Влияние кадмия на уровень экспрессии мРНК гена МТ у *L. stagnalis* в субхроническом эксперименте

Концентрация Cd^{2+} , мг/л	Кратность ПДК [10]	Кратность повышения уровня экспрессии гена МТ относительно контроля	Кол-во особей в группе
7 суток (эксперимент 3)			
0,0001	0,1	3,62*	8
0,001	1	6,02**	8
14 суток (эксперимент 3)			
0,0001	0,1	-	10
0,001	1	0,06	10

Примечания: различия с контролем (уровнем генной экспрессии у моллюсков контрольной группы) считали значимыми: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Выводы

Результаты наших исследований дают основание предполагать, что та изоформа металлотионеина, экспрессия мРНК которой значительно индуцировалась при воздействии 0,1 и 1 ПДК кадмия в 7-суточном эксперименте, возможно, является кадмий-специфичной. Полученные данные также свидетельствуют о це-

лесообразности применения особей *L. stagnalis* лабораторного разведения наряду с другими тест-системами в возрасте от 3 до 5 месяцев для биотестирования жидких металлосодержащих отходов, основанного на оценке генной экспрессии в краткосрочном (не более 7 суток) эксперименте с использованием метода ПЦР в режиме реального времени.

Литература

1. Jabłońska-Czapla M., Nocoń K., Szopa S., Łyko A. Impact of the Pb and Zn ore mining industry on the pollution of the Biała Przemsza River, Poland // *Environ. Monit. Assess.* – 2016. – V. 188, No 5. – P. 262.
2. Sieratowicz A., Schulte-Oehlmann U., Wigh A., Oehlmann J. Effects of test media on reproduction in *Potamopyrgus antipodarum* and of pre-exposure population densities on sensitivity to cadmium in a reproduction test // *J. Environ. Sci. Health. Part A. Tox./Hazard. Subst. Environ. Eng.* – 2013. – V. 48, No 5. – P. 481–488.
3. Ducrot V., Askem C., Azam D., Brettschneider D., Brown R., Charles S. et al. Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda) // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2014. – V. 70, No 3. – P. 605–614.
4. Технология оценки токсичности потенциально опасных химических веществ с использованием альтернативных тест-моделей / Инструкция № 132-1108. Утвержд. Мин. здравоохранения РБ 30.12.2008 г.
5. Ильюкова И.И., Петрова Т.Н., Войтович А.М., Гомолко С.Ю., Борис О.А., Шевцова С.Н. Метод экспериментального определения класса опасности отходов производства / Инструкция по применению № 044-1215. Утвержд. Мин. здравоохранения РБ 7.04.2016 г.
6. Gomot A. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring // *Ecotox. Environ. Saf.* – 1998. – V. 41, No 3. – P. 288–297.
7. De Schampheleere K.A., Koene J.M., Heijerick D.G., Janssen C.R. Reduction of growth and haemolymph Ca levels in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* chronically exposed to cobalt // *Ecotox. Environ. Saf.* – 2008. – V. 71, No 1. – P. 65–70.
8. Brix K.V., Esbaugh A.J., Munley K.M., Grossel M. Investigations into the mechanism of lead toxicity to the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis* // *Aquat. Toxicol.* – 2012. – V. 106–107. – P. 147–156.
9. Dallinger R., Berger B., Hunziker P., Kägi J.H. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism // *Nature.* – 1997. – V. 388. – P. 237–238.
10. Гигиенические нормативы 2.1.5.10-21-2003 // Сборник гигиенических нормативов по разделу коммунальной гигиены. – Мн.: Мин. здравоохранения РБ. – 2004. – С. 38–75.
11. Babenko A.S., Shevtsova S.N., Dromashko S.E. *Lymnaea stagnalis* metallothionein (MT) gene, partial cds [Электронный ресурс] // GenBank: KT253648.1, INV 25-AUG-2015. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT253648.1>.
12. Babenko A.S., Shevtsova S.N., Dromashko S.E. Metallothionein, partial [*Lymnaea stagnalis*] [Электронный ресурс] // GenBank: ALA15336.1, INV 25-AUG-2015. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ALA15336.1>.
13. Primer3 Input [Электронный ресурс] // Primer3 (v. 0.4.0). – Режим доступа: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>.
14. The mfold Web Server [Электронный ресурс] // The RNA Institute, College of Arts and Sciences, State University of New York at Albany. – Режим доступа: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form>.
15. OligoAnalyzer 3.1 [Электронный ресурс] // Integrated DNA Technologies, Inc. – Режим доступа: <http://eu.idtdna.com/calc/analyser>.
16. Vector NTI Advance 11.0 [Электронный ресурс] // ThermoFisher Scientific. – Режим доступа: <http://www.thermofisher.com/by/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software/vector-nti-advance-software.html>.

DROMASHKO S.E.¹, SHEVTSOVA S.N.¹, BABENKO A.S.²

¹ *Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: S.Dromashko@igc.by*

² *N.N. Aleksandrov Republican Scientific and Practical Centre for Oncology and Medical Radiology, Belarus, 223040, Minsk region, Lesnoy town*

LEAD AND CADMIUM INFLUENCES ON THE METALLOTHIONEIN EXPRESSION LEVEL IN *LYMNAEA STAGNALIS* L. ADULTS

Aim. The article deals with the assessment of some heavy metals effects on metallothionein expression in such a test system as the great pond snail *L. stagnalis*. **Methods.** There are methods of mollusk specimen cultivation and gene expression level estimation (PCR in real-time mode), as well as data analysis. **Results.** A significant increase in MT gene expression was observed in both young (4.5 months) and older (7 months) mollusks on the 7th day of exposure to 0.003 mg/L of lead ions as well as significant increase in MT gene expression was observed in older mollusks on the 7th day of exposure to 0.0001–0.001 mg/L of cadmium ions. **Conclusions.** The expediency of *L. stagnalis* adults using at the age of 3 to 5 months with other test systems for biotesting liquid metal-containing waste based on the gene expression evaluation in a short (no more than 7 day) experiment using the Real Time PCR has been shown.

Keywords: *Lymnaea stagnalis*, lead/cadmium, metallothioneins, gene expression, real time PCR.