

УДК 594.3:577.112:546.56

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕДИ
НА ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *LITTORINA*
(MOLLUSCA, GASTROPODA)**

© 2019 г. А. Ф. Жуковская¹, А. А. Чеснокова², Д. В. Косьяненко¹,
А. А. Косьяненко¹, В. П. Челомин¹

¹Тихоокеанский океанологический институт имени В. И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток, Россия

²Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет
(ФГБОУ «Дальрыбвтуз»), Владивосток, Россия
E-mail: avianna@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 14.03.2019; после доработки 17.08.2019;
принята к публикации 25.09.2019; опубликована онлайн 30.09.2019.

Одной из разновидностей антропогенного воздействия на морскую среду является поступление в прибрежные акватории солей тяжёлых металлов, которые способны аккумулироваться в тканях гидробионтов. Накопление тяжёлых металлов приводит к нарушениям в биохимических процессах, что нередко вызывает гибель организма. Чувствительность и устойчивость к токсичности, опосредованно вызванной поступлением металлов в организм морских беспозвоночных, может также зависеть от таких физических факторов, как доступность кислорода, солёность, температура. Цель работы — с помощью биомаркера окислительного стресса — карбониллов белков (окисление белков) — сравнить влияние высоких концентраций меди на представителей морских беспозвоночных, различающихся по своим эколого-физиологическим особенностям, — *Littorina mandshurica* (Schrenk, 1861) и *Littorina squalida* Broderip & G. V. Sowerby I, 1829. Моллюски отобраны в б. Алексева, расположенной в заливе Петра Великого (Японское море) и инкубированы с разными концентрациями Cu^{2+} (10, 40 и 100 мкг·л⁻¹) в среде. Анализ содержания окисленных форм белков в пищеварительной железе исследуемых видов проводили через 5 и 10 дней эксперимента. Выявлена видоспецифическая чувствительность моллюсков как к разным концентрациям ионов меди в среде, так и к различному времени воздействия токсиканта. Показаны зависимости увеличения концентрации карбониллов белков в пищеварительной железе *L. mandshurica*, а также темпов гибели особей *L. squalida* от эколого-физиологических особенностей этих видов.

Ключевые слова: брюхоногие моллюски, карбонилы белков, сульфат меди, окислительный стресс, биомаркеры, *Littorina mandshurica*, *Littorina squalida*

Поступление в прибрежные морские акватории различных токсических веществ, таких как соли тяжёлых металлов, полициклические ароматические углеводороды, поверхностно-активные вещества и пр., влияет на жизнедеятельность гидробионтов, вызывая в них изменения морфологического характера, нарушение протекания процессов на биохимическом уровне, замедление темпов роста и размножения.

Среди тяжёлых металлов медь характеризуется высокой токсичностью в отношении живых организмов, главным образом морских беспозвоночных прибрежной зоны [14]. Повышенный уровень ионов меди в воде приводит к их аккумуляции в тканях гидробионтов. Медь — физиологически

важный микроэлемент, но в больших концентрациях он токсичен для ряда морских и пресноводных гидробионтов. Считается, что токсическое действие меди обусловлено её способностью усиливать процессы свободнорадикального окисления — окислять сульфгидрильные группы белков и ферментов, взаимодействовать с кислородными радикалами и генерировать с помощью реакции Фентона образование высокорективного ОН-радикала, который, в свою очередь, вызывает деградацию макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) и запускает перекисное окисление липидов [16, 19, 20].

Повреждающее действие некоторых токсических веществ, в том числе тяжёлых металлов, может усиливаться при изменении естественных факторов среды, например содержания кислорода [5, 8, 15, 18]. Вследствие этого при оценке повреждающего действия меди на морские организмы необходимо учитывать такой параметр, как их эколого-физиологические особенности [17]. Высоким разнообразием вышеуказанных особенностей характеризуются многочисленные представители типа Моллюски, населяющие толщу воды, литораль, сублитораль. Даже внутри одного рода могут встречаться виды, обитающие в различных экологических условиях. Так, представители рода *Littorina Féruissac, 1822* (Mollusca, Gastropoda) могут населять как литоральную зону со значительными вариациями кислородного режима, так и сублиторальную зону с относительно постоянным содержанием кислорода в воде.

В работе исследованы представители двух видов, занимающих разные экологические ниши, — *Littorina mandshurica* (Schrenk, 1861) и *Littorina squalida* Broderip & G. B. Sowerby I, 1829. Первый населяет каменистую зону литорали, подверженную интенсивному приливно-отливному циклу, а второй обитает на литорали и сублиторали на глубине до 20 м, преимущественно на скалистых, каменистых и гравийно-галечных грунтах, а также на слоевищах водорослей и на листьях морских трав [1].

Цель работы — сравнить влияние высоких концентраций ионов меди в среде на представителей морских Gastropoda — *L. mandshurica* и *L. squalida* (беспозвоночных, различающихся по своим эколого-физиологическим особенностям). Образование окисленных форм белков (карбониллов белков) как одного из биомаркеров окислительного стресса использовали для оценки влияния меди на моллюсков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Особей двух видов рода *Littorina* (тип Mollusca, класс Gastropoda) — *Littorina mandshurica* и *Littorina squalida* — отобрали из экологически чистой акватории б. Алексева на острове Попова в заливе Петра Великого (Японское море) (рис. 1), в июле между 9:00 и 11:00 и перенесли в аквариумы для проведения эксперимента. Часть особей использовали как контрольные образцы; у них пищеварительную железу извлекли на льду с немедленным погружением в жидкий азот.

Задействовали шесть аквариумов — по одному для каждой экспериментальной группы исследуемого вида. Перед экспериментом моллюсков (100 особей на каждый аквариум) адаптировали на протяжении 5 дней в 50-литровых аквариумах с ежедневной сменой воды и постоянной аэрацией при температуре $(18 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. После адаптационного периода особей инкубировали с различными концентрациями Cu^{2+} в среде: 10, 40 и $100 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$. Источником меди являлся раствор CuSO_4 , рабочие концентрации которого пересчитаны на ион меди. Инкубацию с CuSO_4 проводили в течение 5 дней с ежедневной сменой воды и постоянной аэрацией. Для определения концентрации карбониллов в пищеварительной железе из каждого аквариума после 5 дней эксперимента отобрали по 20 особей каждого вида, после 10 дней эксперимента — по 20 особей *L. mandshurica*.

Для биохимического исследования пищеварительную железу исследуемых особей извлекали на льду с немедленным погружением в жидкий азот и дальнейшей транспортировкой в лабораторию.

В ходе эксперимента всех выловленных особей разделили на аналитические группы ($n = 4$). Одна группа объединяла по 5 особей каждого вида.

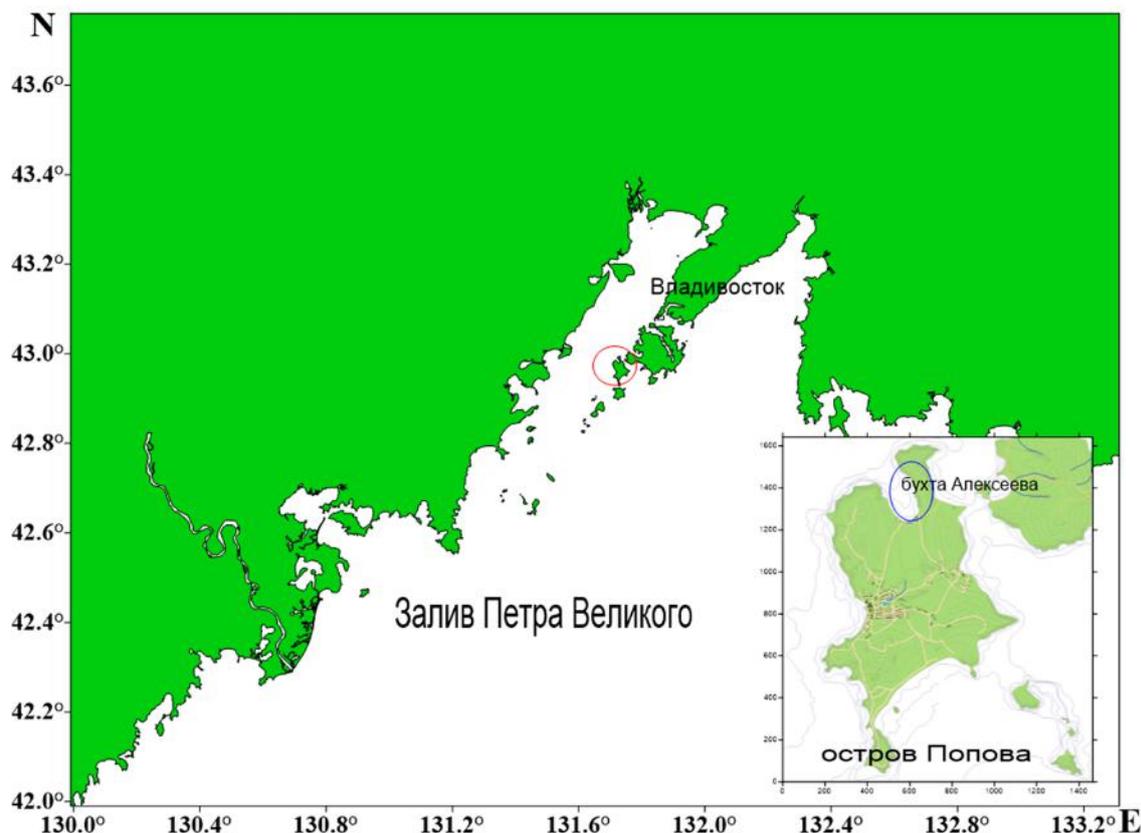


Рис. 1. Карта-схема места отбора особей брюхоногих моллюсков *Littorina mandshurica* и *L. squalida* из акватории б. Алексева (о. Попова, залив Петра Великого, Японское море, Россия) (42°59'03.1"N, 131°43'46.6"E)

Fig. 1. Location of the gastropods *Littorina mandshurica* and *L. squalida* sampling site in Alekseev Bay (Popov Island, Peter the Great Bay, Japan Sea, Russia) (42°59'03.1"N, 131°43'46.6"E)

Для определения карбониллов в исследуемой ткани пищеварительную железу гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) с добавлением 1 Ммоль PMSF (фенилметансульфонилфторид) для ингибирования протеаз. Карбонильные группы белков в пищеварительной железе определяли щелочным методом [13]. К 400 мкл белкового раствора добавляли 400 мкл 10 Ммоль ДНФГ (динитрофенилгидразин) в 0,5 М H_3PO_4 ; через 10 минут инкубации к смеси добавляли 200 мкл 6N NaOH. Через 10 минут измеряли оптическую плотность рабочего раствора при $\lambda = 450$ нм с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-2550.

Концентрацию общего белка и белка в гомогенате определяли модифицированным методом Лоури [10, 11].

Концентрацию карбониллов выражали в Ммоль \cdot мг белка⁻¹ \cdot мл, с учётом коэффициента молярной экстинкции для ДНФГ 22 000 М \cdot см⁻¹.

Статистическую обработку полученных результатов выполнили с использованием Microsoft Excel. О достоверности судили по различиям средних значений, применяя критерий Стьюдента. В расчётах принят 5%-ный уровень значимости. Выборку проверяли на нормальность и на равенство дисперсий, для чего использовали *F*-критерий и критерий Левена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено, что окисление белков и образование карбониллов в пищеварительной железе *L. mandshurica* и *L. squalida* зависят от эколого-физиологических особенностей видов.

В пищеварительной железе контрольных особей *L. squalida* концентрация карбониллов была выше в 1,8 раза, чем у *L. mandshurica*.

Через 5 дней инкубации с $10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ меди в среде концентрация карбониллов у *L. squalida* увеличилась в 1,24 раза, а у *L. mandshurica* — в 1,75 раза относительно контроля (табл. 1, табл. 2). В среде с $40 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ меди у *L. squalida* концентрация карбониллов увеличилась в 1,44 раза относительно контроля, у *L. mandshurica* — в 1,81 раза. В среде с $100 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ меди у *L. mandshurica* концентрация карбониллов увеличилась в 1,9 раза. Для особей *L. squalida* такая доза оказалась критической, и к пятому дню эксперимента смертность составила 95 %. В то же время все особи *L. mandshurica* оставались живыми; концентрация карбониллов резко возросла в 1,9 раза для среды с $10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ меди и в 2,4 раза — для среды с 40 и $100 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ меди через 10 дней содержания моллюсков в экспериментальных условиях (табл. 2).

Таблица 1. Концентрация карбониллов ($\text{Ммоль}\cdot\text{мг белка}^{-1}\cdot\text{мл}$) в пищеварительной железе брюхоногого моллюска *Littorina squalida* после инкубации с CuSO_4

Table 1. Concentration of carbonyls ($\text{Mmol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{ml}$) in the digestive gland of *Littorina squalida* after incubation with CuSO_4

| | Концентрация Cu^{2+} | |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|
| | $10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ | $40 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ |
| Контроль | $1,933 \pm 0,038$ | |
| 5 дней | $2,402 \pm 0,06$ | $2,793 \pm 0,055$ |

Примечание: результаты представлены как (среднее значение \pm стандартное отклонение); $n = 4$

Note: results are presented as (mean value \pm standard deviation); $n = 4$

Таблица 2. Концентрация карбониллов ($\text{Ммоль}\cdot\text{мг белка}^{-1}\cdot\text{мл}$) в пищеварительной железе брюхоногого моллюска *Littorina mandshurica* после инкубации с CuSO_4

Table 2. Concentration of carbonyls ($\text{Mmol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{ml}$) in the digestive gland of *Littorina mandshurica* after incubation with CuSO_4

| | Концентрация Cu^{2+} | | |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | $10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ | $40 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ | $100 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ |
| Контроль | $1,054 \pm 0,026$ | | |
| 5 дней | $1,845 \pm 0,036$ | $1,916 \pm 0,04$ | $2,034 \pm 0,045$ |
| 10 дней | $2,027 \pm 0,05$ | $2,513 \pm 0,056$ | $2,523 \pm 0,05$ |

Примечание: результаты представлены как (среднее значение \pm стандартное отклонение); $n = 4$

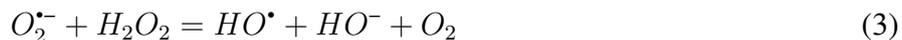
Note: results are presented as (mean value \pm standard deviation); $n = 4$

Таким образом, проведённый эксперимент выявил способность вида *L. mandshurica* выдерживать в течение продолжительного времени высокие концентрации Cu^{2+} в среде (ПДК меди для водных объектов рыбохозяйственного значения составляет $5 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$). У второго исследуемого вида, *L. squalida*, адаптивная стратегия к внезапному повышению концентрации Cu^{2+} в среде обитания, по-видимому, не развита. Устойчивость *L. mandshurica* к изменению среды (к увеличению концентрации Cu^{2+}) напрямую связана с устойчивостью к окислительному стрессу. Механизм этого стресса заключается в образовании в клетке реактивных кислородных радикалов, или активных форм кислорода (далее — АФК), которые не способны утилизироваться по ряду причин и накопление которых приводит к различным метаболическим нарушениям, в том числе к гибели организма. В настоящее время к числу АФК относят производные кислорода радикальной природы: супероксид-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, гидроперекисный радикал HO_2^{\cdot} , гидроксил-радикал (HO^{\cdot}), а также его

реактивные производные — перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2) и пероксинитрит. Супероксид-радикал и перекись водорода в присутствии ионов меди (Cu^{2+}) могут вступать в реакции Фентона:



и Габера — Вейса:



и образовывать гидроксильный радикал, который является самым мощным окислителем, взаимодействующим с нуклеиновыми кислотами и белками [3, 7, 9].

На примере моллюска *Mya arenaria* Linnaeus, 1758 показано: чем выше содержание лабильного железа, тем выше содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях как одного из маркеров окислительного стресса [6]. Другим ключевым показателем устойчивости организма к окислительному стрессу и развитию патологий служит степень окисления белков. Так, у представителя семейства митилид *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 наблюдается увеличение степени окисления белковых молекул в пищеварительной железе вследствие окислительного стресса, вызванного антропогенным воздействием [12].

В отличие от *L. mandshurica*, *L. squalida* обитает в условиях с относительно постоянным содержанием кислорода, поэтому у особей *L. squalida* в тканях пищеварительной железы с повышением концентрации меди в среде увеличивается синтез HO^{\bullet} до такой степени, когда естественная антиоксидантная защита моллюска уже не способна утилизировать этот высокотоксичный радикал. Увеличение производства гидроксил-радикала приводит к возникновению гидроперекисей липидов, образующих ненасыщенные альдегиды, которые взаимодействуют в белковой цепи с остатками лизина, гистидина и цистеина, формируя карбонилы белка. Кроме того, высокие концентрации меди способны вызывать прямое карбонилирование белков. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что при $100 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1} Cu^{2+}$ в среде антиоксидантная система *L. squalida* не справляется с нейтрализацией чрезмерного образования высокореактивных продуктов окислительного стресса, вследствие чего происходит гибель моллюсков. Системы антиоксидантной защиты могут быть ослаблены из-за болезни и/или старения организма (процессов, приводящих к накоплению окислительно-модифицированных белков и в итоге — к потере жизненно необходимых функций). Между тем отобранные для эксперимента представители *L. squalida* и *L. mandshurica* принадлежали к одной возрастной группе и фенотипически были здоровы. По-видимому, выявленные результаты связаны с эколого-физиологическими особенностями исследуемых видов.

Эксперимент показал, что *L. mandshurica* обладает более гибким биохимическим аппаратом, вследствие чего данный вид, являясь эврибионтом, более устойчив к увеличению концентрации ионов меди в среде, чем стенобионтные организмы [16]. Даже при сравнении контрольных особей можно отметить, что белки у *L. mandshurica* менее окислены, чем у *L. squalida*. Первый из упомянутых видов регулярно испытывает на себе недостаток кислорода в момент отлива и повышение концентрации кислорода в среде — в период прилива (табл. 1, табл. 2), и его биохимическая система адаптации постоянно готова к флуктуациям содержания кислорода в среде. Таким образом, устойчивость *L. mandshurica* к изменению среды служит примером развития механизмов, которые отражают особенность в стратегии биохимической адаптации, когда в ответ на изменение каких-либо условий в среде замещается функция того или иного сегмента биохимических путей. Известно, что *L. mandshurica* способна переносить недостаток кислорода, и эта особенность связана с увеличением синтеза низкомолекулярных антиоксидантов [2], что и является одним из защитных механизмов, уменьшающих окислительное повреждение белков. Когда период недостатка кислорода сменяется периодом увеличения его содержания в среде, в клетках тканей моллюска сохраняется

пул синтезированных компонентов антиоксидантной защиты с предыдущего периода, что делает его устойчивым к окислительному повреждению. Слаженность в работе антиоксидантной системы защиты наблюдается и у двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853): присутствие в среде ионов Cu^{2+} при недостатке кислорода вызывает активацию свободнорадикальных процессов. Один из защитных механизмов у данного вида — мобилизация ферментативного звена антиоксидантной системы [4].

У исследуемого нами вида *L. mandshurica* при добавлении в среду Cu^{2+} в результате реакций Фентона [(1) и (2)] и Габера — Вейса (3) должна увеличиваться продукция АФК. Предполагается, что уровень образования карбониллов белков зависит от интенсивности формирования АФК. В случае невысоких концентраций меди и, по-видимому, умеренного возрастания АФК регистрируется незначительное увеличение концентрации карбониллов в ткани исследуемых моллюсков. При значимом повышении концентраций меди уровень карбонилирования белков возрастает. Интересен тот факт, что при чрезмерной, заведомо токсичной дозе Cu^{2+} ($100 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) концентрация карбониллов в ткани сопоставима с показателями в эксперименте, где концентрация Cu^{2+} в среде значительно ниже ($40 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) (табл. 2). Данный факт мы связываем с тем, что высокая пластичность метаболизма и, как следствие, адаптация, наблюдаемая при невысоких концентрациях, сменяются компенсацией, направленной на временное возмещение функции повреждённых структур. Именно поэтому мы полагаем, что способность вида *L. mahdshurica* развивать или «переключать» биохимический аппарат адаптации к изменяющимся условиям среды является фактором устойчивости и выживания.

Заключение. Исследуемые виды рода *Littorina* по-разному реагируют на воздействие ионов меди в среде. Так, *Littorina squalida*, обитающая в сублиторальной зоне с относительно постоянным содержанием кислорода в воде, не способна переносить высокие концентрации меди. В то же время *Littorina mandshurica*, повсеместно встречающаяся в зоне литорали и хорошо адаптированная к значительным флуктуациям содержания кислорода в среде в связи с приливно-отливным циклом, более устойчива к очень высоким концентрациям меди ($100 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$). Используемый в качестве биомаркера окислительного стресса показатель содержания карбониллов белков отражает более высокую степень окисления белка в ткани пищеварительной железы у брюхоногого моллюска *Littorina squalida*.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ТОИ ДВО РАН по теме «Влияние природных и антропогенных факторов на биогеохимические процессы и состояние биоты в морских экосистемах» (№ гос. регистрации АААА-А17-117030110038-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Животные и растения залива Петра Великого. Ленинград : Наука, Ленинград. отд-е, 1976. 362 с. [*Zhivotnye i rasteniya zaliva Petra Velikogo*. Leningrad: Nauka, Leningrad. otd-e, 1976, 362 p. (in Russ.)]
2. Истомина А. А., Довженко Н. В., Бельчева Н. Н., Челомин В. П. Влияние меди на антиоксидантную систему брюхоногих моллюсков *Littorina mandshurica* и *Tegula rustica* в условиях гипоксии // *Вестник СПбГУ. Серия 3: Биология*. 2011. Вып. 4. С. 25–31. [Istomina A. A., Dovzhenko N. V., Bel'cheva N. N., Chelomin V. P. Effect of copper on the antioxidant system in the gastropods *Littorina mandshurica* and *Tegula rustica* during air exposure. *Vestnik SpbGU. Seriya 3: Biologiya*, 2011, iss. 4, pp. 25–31. (in Russ.)]
3. Almroth B. C., Sturve J., Berglund Å., Förlin L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) measured as protein carbonyl and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 2005, vol. 73, iss. 2, pp. 171–180. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.007>
4. Belcheva N., Istomina A., Dovzhenko N., Lishavskaya T., Chelomin V. Using heavy metal content and lipid peroxidation indicators in the tissues of the mussel *Crenomytilus grayanus* for pollution assessment after marine environmental remediation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, vol. 95, iss. 4, pp. 481–487. <http://doi.org/10.1007/s00128-015-1624-3>

5. Funes V., Alhama J., Navas J.I., López-Barea J., Peinado J. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*, 2006, vol. 139, iss. 2, pp. 214–223. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.05.016>
6. Gonzales P. M., Wilhelms-Dick D., Abele D., Puntarulo S. Iron in coastal marine ecosystems: Role in oxidative stress. In: *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* / Abele D., Vazquez-Medina J. P., Zenteno-Savin (Eds). Boston ; Oxford: Blackwell Publishing, 2012, pp. 115–125.
7. Grimsrud P. A., Xie H., Griffin T. J., Bernlohr D. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 3, pp. 21837–21841. <http://doi.org/10.1074/jbc.R700019200>
8. Istomina A., Belcheva N., Chelomin V. Antioxidant system of the intertidal mollusk *Littorina kurila* in its natural habitat. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 2013, vol. 2, no. 2A, pp. 713–718.
9. Livingstone D. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2003, vol. 154, no. 6, pp. 427–430. https://www.revmedvet.com/2003/RMV154_427_430.pdf
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, iss. 1, pp. 265–275.
11. Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 1978, vol. 87, iss. 1, pp. 206–210. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90586-9](http://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9)
12. McDonagh B., Tyther R., Sheehan D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 2005, vol. 73, iss. 3, pp. 315–326. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.020>
13. Mesquita C.S., Oliveira R., Bento F., Geraldo D., Rodrigues J.V., Marcos J.C. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 2014, vol. 458, pp. 69–71. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>
14. O'Connor T.P., Lauenstein G.G. Status and trends of copper concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Chemistry*, 2005, vol. 97, iss. 1–2, pp. 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.04.007>
15. Veldhuizen-Tsoerkan M.B., Holwerda D.A., Zandee D.I. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussel exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1991, vol. 20, iss. 2, pp. 259–265. <https://doi.org/10.1007/BF01055913>
16. Vosloo D., Sara J., Vosloo A. Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquatic Toxicology*, 2012, vol. 106–107, pp. 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.001>
17. Wu R.S.S. Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, vol. 45, iss. 1–12, pp. 35–45.
18. Xiu M., Pan L., Jin Q. Bioaccumulation and oxidative damage in juvenile scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and chrysene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, vol. 107, pp. 103–110. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.016>
19. Xu K., Tang Z., Liu S., Liao Z., Hu X., Liu L., Wang Z., Qi P. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, vol. 82, pp. 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.016>
20. Zitoun R., Clearwater S.J., Hassler C., Thompson K.J., Albert A., Sander S.G. Copper toxicity to blue mussel embryos (*Mytilus galloprovincialis*): The effect of natural dissolved organic matter on copper toxicity in estuarine waters. *Science of the Total Environment*, 2019, vol. 653, pp. 300–314. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.263>

**EFFECT OF Cu^{2+} HIGH CONCENTRATIONS ON PROTEIN OXIDATION
(CARBONYL PROTEINS) IN DIGESTIVE GLAND
OF SOME REPRESENTATIVES OF *LITTORINA* GENUS
(MOLLUSCA, GASTROPODA)**

**A. F. Zhukovskaya¹, A. A. Chesnokova², D. V. Kos'yanenko¹,
A. A. Kos'yanenko¹, and V. P. Chelomin¹**

¹V. I. Ilichev Pacific Oceanological Institute of the Far Eastern Branch of RAS, Vladivostok, Russian Federation

²Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, Russian Federation

E-mail: avianna@poi.dvo.ru

One of the anthropogenic impacts on the marine environment is the entry into the coastal waters of heavy metals easily accumulating in the tissues of marine hydrobionts. The heavy metals accumulation leads to disruptions in the normal course of biochemical processes, which often result in the death of the total organism. The metals toxicity to the organism can be enhanced due to a number of physical factors, such as oxygen availability, salinity, and temperature fluctuations. The aim of the work is to compare the effect of copper ions high concentrations on representatives of marine invertebrates differing in ecological and physiological characteristics (*Littorina mandshurica* (Schrenk, 1861) and *Littorina squalida* Broderip & G. B. Sowerby I, 1829) using oxidative stress biomarker – carbonyl proteins. Molluscs were taken from Alekseev Bay of the Peter the Great Bay (Sea of Japan, Russia) and incubated at different concentrations of Cu^{2+} (10, 40 and 100 μg per l) in the seawater. Analysis of the content of proteins oxidized forms in the digestive gland of the studied species was carried out after 5 and 10 days of the experiment. In the course of the experiment, the species sensitivity to different concentrations of Cu^{2+} and to the time of toxicant exposure was revealed. The dependence of the obtained results (an increase of the protein carbonyls concentration in the digestive gland of *L. mandshurica* and the death of individuals of *L. squalida*) on ecological and physiological features of the studied species is shown.

Keywords: Gastropod, proteins carbonyl, copper, oxidative stress, biomarkers, *Littorina mandshurica*, *Littorina squalida*