

УДК 574.24: 57.017.322

ВЛИЯНИЕ МЕДИ НА КОМПОНЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРЕСНОВОДНОГО ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANODONTA CYGNEA*

**И. В. Суховская¹, С. Р. Курпе², Е. В. Борвинская¹, А. А. Кочнева¹,
Н. Н. Фокина¹**

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² Петрозаводский государственный университет, Россия

Исследованы эффекты аккумуляции меди и ее воздействия на работу некоторых компонентов системы антиоксидантной защиты (АОС) – CAT, GST, GSH – в пищеварительной железе пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* в условиях аквариального эксперимента. После 12-дневной акклимации моллюсков рассадили по аквариумам с концентрацией Cu^{2+} 0, 5, 50, 100 и 250 мкг/л. Образцы тканей гепатопанкреаса для анализа отбирали через 1, 3 и 7 суток. В ткани определяли содержание ионов меди, активность GST и CAT, а также концентрацию GSH. Показано, что процесс накопления носит дозо- и времязависимый характер. Аккумулированный в данной концентрации металл не привел к гибели животных. Скорость накопления металла в исследованном органе увеличивалась с повышением концентрации ионов меди в воде. Воздействие повышенных концентраций меди приводит к адаптивному изменению активности ферментов АОС у беззубки, направленному на обезвреживание продуктов окислительных реакций. Изменения в активности ферментов АОС (CAT и GST) отмечены в основном на седьмые сутки эксперимента при самых высоких из протестированных концентрациях меди. GST проявила себя наиболее стабильным ферментом. Уровень GSH в пищеварительной железе менялся через одни сутки от начала эксперимента, подтверждая участие этого трипептида в первом эшелоне защиты от ксенобиотиков. Ионы меди обладают кумулятивным эффектом. Отмеченные на 7-е сутки изменения активности ферментов при концентрации Cu^{2+} 250 мкг/л позволяют предположить, что более длительное действие меди, даже в незначительных концентрациях, может приводить к негативным последствиям.

Ключевые слова: оксидативный стресс; система антиоксидантной защиты; адаптация; аккумуляция металла; медь.

**I. V. Sukhovskaya, S. R. Kurpe, E. V. Borvinskaya, A. A. Kochneva,
N. N. Fokina. COPPER EFFECT ON COMPONENTS OF THE ANTIOXIDANT
SYSTEM OF THE DIGESTIVE GLAND IN THE FRESHWATER MUSSEL
*ANODONTA CYGNEA***

The effects of copper accumulation and its impact on the functioning of some components of the antioxidant system (AOS) – CAT, GST, GSH – in the digestive gland of the freshwater mussel *Anodonta cygnea* were studied in an aquarium experiment. After a 12-day acclimation, the mussels were divided among aquariums with Cu^{2+} concentrations

of 0, 5, 50, 100, and 250 µg/L. Hepatopancreas tissue samples were taken for analysis after 1, 3, and 7 days. Copper ions content, GST and CAT activity, as well as GSH concentration were determined in the tissue. The accumulation process was shown to be dose- and time-dependent. The metal accumulated in this concentration was not lethal. The rate of the metal accumulation in the studied organ increased along with the concentration of copper ions in the water. The activity of AOS enzymes in the swan mussel is modified as an adaptation in response to elevated copper concentrations to neutralize the products of oxidative reactions. Changes in the activity of AOS enzymes (CAT and GST) were observed mainly on the seventh day of the experiment at the highest copper concentrations tested. GST proved to be the most stable enzyme. The GSH level in the digestive gland changed 1 day after the start of the experiment, corroborating this tripeptide is involved in the first wave of protection against xenobiotics. Copper ions have a cumulative effect. The changes in enzyme activity observed on day 7 at Cu²⁺ concentration of 250 µg/L suggest that a longer exposure to copper, even in low concentrations, can be detrimental.

Key words: oxidative stress; antioxidant system; adaptation; metal accumulation; copper.

Введение

Медь является распространенным элементом и в природных водах в основном обнаруживается в виде катиона Cu²⁺, обычно связанного с органическими веществами. В природных водах и источниках водоснабжения Российской Федерации медь, как правило, содержится в концентрациях около 1 мкг/л. В водоемах на территории европейской части России – в пределах 0,5–6,6 мкг/л [Моисеенко и др., 2006], в воде Онежского озера – 0,7–1,2 мкг/л, в воде Ладожского озера – 1,4 мкг/л [Озера..., 2013].

Однако вблизи меднорудных предприятий отмечаются значительные колебания концентрации металла в водоемах – от 1 до 980 мкг/л [Шилова, 2014; Государственный..., 2018].

Этот элемент необходим для живых организмов, однако избыточные концентрации меди чрезвычайно токсичны. Ионы Cu (II) образуют довольно стабильные комплексы с атомами O- и S- или N-, а соответственно, с лигандами белков, и поэтому с трудом выводятся из организма. Токсичность меди обусловлена ее способностью ингибировать ферменты и нарушать осморегуляцию [Viarengo et al., 1996], снижать иммунную функцию [Parry, Pipe, 2004], подавлять дыхание [Rao et al., 2000], вызывать повреждение мембран и другие вредные эффекты [Duffus, 2002]. Поэтому превышение фоновых значений концентраций меди в водоемах, подвергнутых антропогенному воздействию, особенно из-за добычи металлических руд, применения минеральных удобрений, использования средств против обрастания, фунгицидов и ларвицидов, несет угрозу для природных экосистем и человека [Sinicropi et al., 2010; Syversen, Kaur, 2012; Даувальтер, Ка-

шулин, 2015]. В Российской Федерации ПДК меди в питьевой воде установлена на уровне 1 мг/л, то есть на 1–2 порядка выше фоновых значений, тогда как в ряде стран ЕС (Финляндия, Норвегия и др.) этот показатель несколько ниже и находится в пределах 0,4 мг/л [Directive..., 2008; Мишукова и др., 2015]. В то же время ПДК_{вр} нормативами определена как 1 мкг/л [Приказ...]. Показано, что концентрации больше 1000 мкг Cu²⁺/л вызывают выраженное негативное воздействие на мидий [Sze, Lee, 2000; Parry, Pipe, 2004; Wang et al., 2007], рыбу [Larsen et al., 1997] и ракообразных [Ahsanullah, Williams, 1991; Conradi, Depledge, 1998; Wang et al., 2007; March et al., 2007], однако влияние более низких концентраций меди, особенно на пресноводных гидробионтов, изучено слабо.

Двустворчатые моллюски широко используются в качестве тестовых организмов в лабораторных и полевых экотоксикологических исследованиях [Radenac et al., 1997; Lysenko et al., 2015] для оценки качества воды и подсчета рисков для здоровья человека [Cajaraville et al., 2000; Chapman, 2008; Lyons et al., 2010; Guéguen et al., 2011]. В процессе фильтрации они способны изымать из воды растворенные тяжелые металлы, включая медь, и накапливать их в мягких тканях [Sze, Lee, 2000; Canesi et al., 2012]. Отдельные двустворчатые моллюски могут фильтровать более литра воды в час [Foster-Smith, 1975] и, следовательно, потребляют большое количество переносимых водой загрязнителей. В результате моллюски могут накапливать металлы в тканях до феноменальных концентраций [Wang et al., 2014]. В целом показано, что у двустворчатых моллюсков константы скорости поглощения металла сопоставимы с ракообразными и в десять раз выше, чем у рыб [Marigomez et al., 2002]. Опи-

сание биологических эффектов воздействия тяжелых металлов на моллюсков и выяснение молекулярных основ успешной адаптации этих животных к высоким концентрациям указанных загрязнителей имеет большое значение для прогнозирования состояния водных экосистем в условиях возрастающего антропогенного воздействия. При этом следует отметить, что большинство исследований посвящено изучению морских моллюсков, тогда как литературы, посвященной пресноводным моллюскам, значительно меньше, и эта тема продолжает вызывать интерес на протяжении многих лет [Huggett et al., 1992; Лукьянова, 2001; Чуйко, 2014].

Известно, что металлы с переходной валентностью, в том числе медь, могут стимулировать образование избытка активных форм кислорода (АФК) и нарушать баланс окислительно-восстановительных реакций, в норме поддерживаемый в аэробной клетке (окислительный стресс) [Regoli, Giuliani, 2014]. Для защиты от окислительного стресса живые организмы обладают различными биохимическими системами обезвреживания и выведения АФК. К компонентам антиоксидантной системы (АОС) относятся низкомолекулярные соединения, такие как восстановленный глутатион (GSH), витамины А и Е, антиоксидантные ферменты – супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), пероксидаза (Px), глутатион-S-трансфераза (GST) и др. [Regoli, Giuliani, 2014]. Показатели работы антиоксидантных ферментов могут быть использованы для оценки устойчивости организма к окислительному стрессу, вызванному накоплением тяжелых металлов [Vega-López et al., 2013].

Целью данного исследования было выявить возможные взаимосвязи между концентрацией металла в окружающей среде и активностью ферментов АОС у пресноводного двустворчатого моллюска беззубки *Anodonta cygnea* при разном уровне токсической нагрузки (при однократном и многократном добавлении в воду 0, 10, 50, 100 и 250 мкг/л Cu^{2+}). Также было исследовано накопление меди в пищеварительной железе (гепатопанкреасе) моллюска в зависимости от продолжительности воздействия и концентрации металла в воде. В эксперименте использовали как низкие концентрации меди, характерные для природных биотопов, так и концентрации, соответствующие среднему уровню антропогенного загрязнения. Учитывая, что беззубка является широко распространенным в Европе видом пресноводных моллюсков, важно оценить потенциал использования *A. cygnea* в качестве биоиндикатора для биомониторинга пресноводных экосистем.

Материалы и методы

Исследования проведены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Сбор тестовых организмов и описание аквариального эксперимента

Сбор моллюсков *A. cygnea* проводили в июле 2018 г. в русле реки Уссун (62°20'29" с. ш., 33°48'54" в. д.) в Северо-Западном регионе России, в котором этот вид не находится под охраной. В день вылова моллюски были перенесены в лабораторию в контейнере с водой с охлаждением. Для эксперимента сформировали однородную (CV = 5,4 %) размерную выборку животных, длина которых составляла $71,8 \pm 2,8$ мм.

Животных помещали в аквариумы с аэрируемой водопроводной водой объемом 18 л, по 10 моллюсков в каждый. На протяжении всего эксперимента в аквариумах с помощью термостатирующего устройства Hailea HC-250A поддерживалась постоянная температура +20 °С, соответствующая температуре в природном водоеме в период сбора моллюсков. Для поддержания в воде допустимого уровня соединений азота один раз в сутки в аквариумах проводили замену 10 л воды. Воду для замены с заданной температурой и оксигенацией готовили заранее.

После 12-дневной акклимации моллюсков к лабораторным условиям аквариумы были разделены на контрольные и опытные. В экспериментальные аквариумы добавили предварительно приготовленный стоковый раствор 250 мг/л CuCl_2 в дистиллированной воде до нужной концентрации. Каждые сутки из аквариумов сливали 10 л воды и сразу наполняли их новой порцией заранее приготовленной воды с заданной концентрацией меди. Часть животных извлекали для анализа через сутки после начала эксперимента, часть – после трехкратной (3 суток) и семикратной (7 суток) замены воды с добавлением металла. Моллюскам из контрольных групп добавляли подготовленную воду без дополнительного добавления солей меди. На протяжении всего периода акклимации и эксперимента моллюски не получали корм.

Гидрохимический анализ

Ежедневный контроль уровня pH в воде проводили с помощью pH-метра Hanna HI 2210.

Концентрацию кислорода измеряли с помощью оксиметра ССО-505 «Elementron». Содержание ионов аммония, нитриты и нитраты определяли с помощью аквариумных экспресс-тестов НИЛПА «НеваТропик». Используя систему капиллярного электрофореза «Капель-104Т», оснащенного кварцевым капилляром (внутренний диаметр 75 мкм, эффективная длина 50 см), определяли содержание сульфатов, фосфатов и хлоридов в аквариумной воде каждой исследуемой группы. Пробы в соответствии с требованиями методики были проанализированы при 20 °С и длине волны 254 и 374 нм в течение 24 часов после отбора. Перед анализом пробы центрифугировали в течение 5 мин при 5000 g. После регистрации электрофореграммы пики были идентифицированы с применением программного обеспечения по ТУ 4215-023-20506233-2006. Концентрацию определяемых в воде анионов вычисляли по градуировочному графику, построенному с помощью стандартных растворов.

Содержание основных катионов (Na, Ca, K, Mg) и меди в аквариумной воде определяли масс-спектральным методом, используя прибор XSeries-2 ICP-MS (Thermo) [Слуковский, Полякова, 2017]. Отбор проб воды для определения содержания в ней меди проводили перед заменой воды, т. е. спустя сутки после добавления соли. Основные показатели воды в аквариумах представлены в таблице.

Определение содержания меди в тканях моллюска

Для определения количества аккумулярованной меди в моллюсках по окончании эксперимента из каждого аквариума брали двух моллюсков, отделяли мягкие ткани от раковины и после глубокой заморозки при –80 °С сушили с помощью лиофильной сушки FreeZone (Labconco). Помимо этого, в качестве контрольной точки взяли моллюска (n=1) сразу после вылова из водоема.

Высушенные образцы массой 0,1 г разлагали смесью кислот в открытой системе [Слуковский, 2015]. Образцы помещали в тефлоновые стаканы, добавляли 0,1 мл раствора, содержащего 8 мкг/л 161 Dy (контроль химического выхода при проведении процедуры разложения образцов), смачивали несколькими каплями деионизованной воды. Затем добавляли 0,5 мл 70% HClO₄ (Supratur, Merck), 3 мл HF, 0,5 мл HNO₃ и выпаривали до появления интенсивных белых паров. Кислоты HF, HNO₃, HCl были подвергнуты дополнительной очистке в перегонном аппарате PTFE/PFA Subboiling

Ecol R. Стаканы охлаждали, их стенки обмывали водой и раствор снова упаривали до влажных солей. Затем добавляли 2 мл HCl и 0,2 мл 0,1М раствора H₃BO₃ и упаривали до объема 0,5–0,7 мл. Полученные растворы переносили в полиэтиленовые бюксы, разбавляли деионизованной водой до объема 20 мл. Далее образцы разбавляли в 20 раз и определяли в них содержание меди масс-спектральным методом на приборе XSeries-2 ICP-MS.

Биохимический анализ

После завершения эксперимента моллюсков извлекали из аквариума, вскрывали и вырезали пищеварительную железу. Непосредственно после изъятия ткани были заморожены в жидком азоте и хранились при температуре –80 °С до анализа. В день исследования замороженные образцы пищеварительной железы массой 0,1–0,4 г гомогенизировали с помощью гомогенизатора Digital Disruptor Genie в 50 мМ буферном растворе Трис-HCl (pH 7,5) при 5-кратном разбавлении. Гомогенат центрифугировали при 60 000 g в течение 1 часа при 4 °С на центрифуге Beckman Coulter Allegra 64R. Полученный супернатант использовали для определения биохимических показателей.

Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по скорости связывания восстановленного глутатиона (GSH) с субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) [Habig et al., 1974]. В лунку планшета вносили 0,225 мкл реакционной смеси, содержавшей 1 мМ CDNB и 1 мМ GSH в 0,125 М фосфатном буфере (pH 6,5). Реакцию начинали добавлением 0,025 мкл раствора гомогената. Увеличение оптической плотности раствора при длине волны 340 нм фиксировали непрерывно в течение пяти минут при 25 °С с помощью планшетного ридера CLARIOstar Basic Unit (BMG Labtech). Относительную активность фермента в тканях рыб представляли как количество μМ продукта реакции, образовавшихся за минуту, в пересчете на мг растворимого белка в ткани (μМ/мг белка*мин).

Активность каталазы (CAT) определяли согласно Beers и Sizer [1952] с модификациями. Для определения активности фермента использовали заранее приготовленный 0,05 М трис-HCl буфер, pH 7,4. В день анализа готовили реакционную смесь, которая содержала 25 мМ перекиси водорода в 0,05 М фосфатном буфере. После добавления гомогената разложение перекиси водорода измеряли по уменьшению оптической плотности раствора при длине волны 240 нм в течение 3 минут

Гидрохимическая характеристика аквариумной воды

Hydrochemical description of the aquarium water

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Номер аквариума Aquarium No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| Конц. вносимого Cu^{2+} , мкг/л Contrib. Cu^{2+} conc., $\mu\text{g/l}$ | 0 | 10 | 50 | 100 | 250 | 0 | 5 | 50 | 100 | 250 | 0 | 5 | 50 | 100 | 250 |
| Экспозиция опыта, дни Exp. exposure, days | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Длит. воздействия, часы Time of exposure, hrs | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 72 | 72 | 72 | 72 | 72 | 168 | 168 | 168 | 168 | 168 |
| pH | 6,9–7,0 | 6,9–7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 6,9–7,0 | 6,9–7,0 | 6,9–7,0 | 7,2 | 7,3 | 7,0 | 6,9 | 7,0 | 7,2 |
| Темп. воды, °C Water temp., °C | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 | 20 ± 1 |
| Конц. кислорода, мг/л Oxygen conc., mg/l | 7,0 ± 0,1 | 7,8 ± 0,5 | 7,1 ± 0,1 | 7,7 ± 0,4 | 7,0 | 7,1 ± 0,3 | 7,2 ± 0,3 | 7,6 ± 0,6 | 7,4 ± 0,3 | 7,1 ± 0,3 | 7,2 ± 0,3 | 7,6 ± 0,6 | 7,2 ± 0,3 | 7,1 ± 0,1 | 7,1 ± 0,3 |
| Конц. NO_2^- , мг/л NO_2^- conc., mg/l | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 |
| Конц. NO_3^- , мг/л NO_3^- conc., mg/l | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 | ≤ 5 |
| Конц. NH_4^+ , мг/л NH_4^+ conc., mg/l | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Конц. SO_4^{2-} , мг/л SO_4^{2-} conc., mg/l | 12,81 ± 1,28 | 13,01 ± 1,3 | 13,01 ± 1,3 | 12,59 ± 1,26 | 13,47 ± 1,35 | 16,5 ± 1,7 | 16,3 ± 1,6 | 16,6 ± 1,7 | 16,5 ± 1,7 | 16,6 ± 1,7 | 16,1 ± 1,6 | 16,3 ± 1,6 | 16,2 ± 1,6 | 16,0 ± 1,6 | 16,3 ± 1,6 |
| Конц. Cl, мг/л Cl conc., mg/l | 4,54 ± 1,09 | 5,35 ± 0,54 | 5,35 ± 0,54 | 5,31 ± 0,53 | 5,77 ± 0,58 | 6,1 ± 0,6 | 5,6 ± 0,6 | 5,9 ± 0,6 | 5,3 ± 0,5 | 6,3 ± 0,6 | 5,9 ± 0,6 | 6,2 ± 0,6 | 6,3 ± 0,6 | 5,9 ± 0,6 | 6,1 ± 0,6 |
| Конц. PO_4^{3-} , мг/л PO_4^{3-} conc., mg/l | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 | ≤ 0,25 |
| Конц. HCO_3^- , мг/л HCO_3^- conc., mg/l | 17,7 ± 3,7 | 17,7 ± 3,7 | 20,7 ± 4,3 | 17,7 ± 3,7 | 17,7 ± 3,7 | 17,6 ± 3,7 | 20,5 ± 4,3 | 17,7 ± 3,7 | 17,6 ± 3,7 | 20,5 ± 4,3 | 17,6 ± 3,7 | 17,6 ± 3,7 | 20,5 ± 4,3 | 26,4 ± 5,5 | 38,1 ± 4,6 |
| Конц. Mg, мг/л Mg conc., mg/l | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 | 2,2 ± 0,04 |
| Конц. Ca, мг/л Ca conc., mg/l | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 | 16 ± 0,21 |
| Конц. Cu, мг/л Cu conc., mg/l | 1,54 | 2,12 | 9,40 | 10,39 | 23,42 | 3,01 | 4,14 | 13,07 | 20,78 | 47,83 | 2,32 | 5,03 | 19,54 | 39,10 | 89,84 |

при 25 °С. Относительную активность фермента выражали как μM перекиси водорода/мг белка*мин.

Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли согласно методике Hissin и Hilf [1976] с модификациями. Растворимые белки гомогената осаждали с помощью трихлоруксусной кислоты (конечная конц. 5 %). Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 2500 g в течение 15 мин. Полученный супернатант нейтрализовали до pH 8,5 с помощью 5 NNaOH, затем добавляли 0,4 M трис-HCl буфер (pH 8,5), содержащий 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich). Затем в реакционную смесь добавляли 0,01% раствор ортофталевого альдегида (Sigma-Aldrich) в метаноле, приготовленный непосредственно перед использованием. После перемешивания смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и затем измеряли ее флуоресценцию (E_m – 420 нм, E_x – 350 нм) при 25 °С. Концентрацию глутатиона вычисляли согласно калибровочному графику, построенному по результатам измерений растворов с разной концентрацией GSH (Sigma-Aldrich) в 0,4 M трис-HCl буфере (pH 8,5) с добавлением 5 mM EDTA. Относительную концентрацию глутатиона выражали как мкг GSH/мг белка.

Концентрацию белка определяли в супернатанте спектрофотометрически при 26 °С, по величине поглощения при 220 нм (длина волны поглощения пептидных связей) [Noble, Bailey, 2009; Суховская и др., 2010].

Статистическая обработка данных

Различия между выборками оценивались с помощью непараметрического однофакторного анализа (PERMANOVA). Апостериорный анализ осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Обработка данных проводилась с использованием пакета программ Excel и Past 3. Анализ корреляций между исследуемыми показателями осуществляли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Данные на рисунках и в таблице представлены в виде медианы \pm половина межквартильного размаха. Достоверными различия считались при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Во время эксперимента концентрация кислорода, температура, pH воды и содержание в воде биогенных соединений (аммиак, нитриты, нитраты, фосфаты), основных анионов

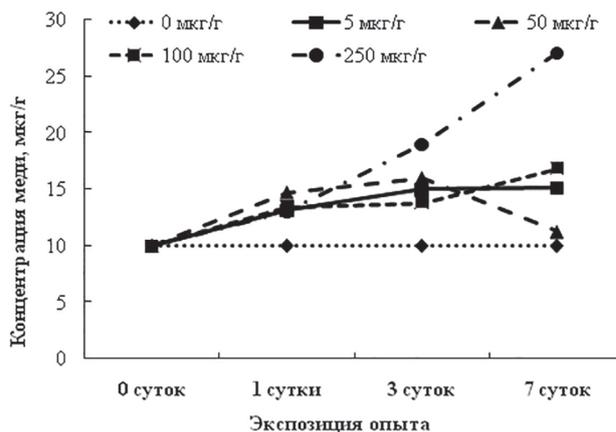


Рис. 1. Содержание ионов меди в пищеварительной железе двусторчатого моллюска *Anodonta cygnea*:

по оси ординат – концентрация меди в гепатопанкреасе моллюска мкг/г

Fig. 1. Content of copper ions in the digestive gland of the mussel *Anodonta cygnea*:

along the ordinate axis – the concentration of copper in the hepatopancreas of the mussel, $\mu\text{g/g}$

(сульфаты, фосфаты, хлориды, гидрокарбонаты) и катионов (Ca, Mg) варьировали не более чем на 10 % (табл.). Количество дополнительных хлорид-ионов, которые вносили в воду в составе хлорида меди, было незначительным (4,5–6,0 мкг/л) и составляло 0,1–1,0 % от фоновой концентрации хлорид-ионов в аквариумной воде (табл.).

Исследование содержания меди в мягких тканях тела показало, что моллюски аккумулируют этот металл из воды. Накопление меди в ткани зависело от концентрации ионов меди в воде (коэффициент корреляции $r = 0,86$), а также от длительности воздействия ($r = 0,52$) (рис. 1). Несмотря на поступление меди в организм, животные в аквариумах со всеми протестированными концентрациями не умирали и продолжали активно фильтровать.

Самая высокая скорость накопления металла в тканях моллюска, достигшая максимума на 7-е сутки эксперимента, отмечена у беззубки из аквариума с наибольшей концентрацией металла в воде (250 мкг/л). При этом у моллюсков из аквариумов, в которые добавляли более низкие концентрации меди (5, 50 и 100 мкг/л), значительных различий в скорости накопления металла в тканях выявлено не было. Более того, в пищеварительной железе этих моллюсков после кратковременного увеличения концентрации меди в конце первых суток экспозиции аккумуляция металла резко замедлялась или даже происходило уменьшение концентрации загрязнителя (при добавлении 50 мкг Cu^{2+} /л на 7-е сутки). Похожая динамика аккумуляции

меди была показана в гепатопанкреасе мидий *Mytilus galloprovincialis*: очень медленное накопление металла происходит из воды с концентрацией меди 0,2–20 мг Cu^{2+} /л, тогда как при воздействии 50 мг/л Cu^{2+} накопление Cu резко возрастает [Peric et al., 2017].

Замедление аккумуляции меди может свидетельствовать о наличии у *A. cygnea* пути активного выведения ионов меди из организма, который нарушается при воздействии избыточных концентраций меди. Возможные пути экскреции меди у моллюсков изучены плохо. Отмечают усиление секреции слизи у моллюсков, подверженных умеренным дозам металла, однако анализы элементного состава слизи отсутствуют [Sze, Lee, 1995; Vosloo et al., 2012]. Вероятность выведения тяжелых металлов с фекалиями, а также через почки и железы, вырабатывающие биссусные нити, была показана у мидий, однако для меди этот механизм не изучался [George et al., 1976, 1982]. Кроме того, известно, что присутствие органических хелатов в водном растворе заметно увеличивает выживаемость организмов, а присутствие в воде комплексообразующих агентов значительно снижает токсичность меди. Водопроводная вода, которая была использована в нашем эксперименте, содержала минимальное количество органических соединений. Следовательно, ионы меди, добавленные в нее, находились в наиболее токсичной форме, в отличие от меди, попадающей в природную воду.

Полученные результаты и их сравнение с данными литературы свидетельствуют о том, что эффективность поглощения меди у двустворчатых моллюсков зависит от количества растворенного металла и от формы, в которой он находится в воде, от видовой принадлежности живого организма, а также, как уже было показано ранее, от скорости фильтрации, зависящей от температуры среды [Cosson et al., 2008].

Биохимические показатели в гепатопанкреасе *A. cygnea*

Известно, что медь, как металл с переходной валентностью, участвует в окислительно-восстановительной реакции Фентона, источника опасных гидроксильных радикалов, провоцирующих окислительный стресс. Окислительный стресс, в свою очередь, означает запуск каскада окисления липидов биомембран, которое вызывает серьезное нарушение работы клетки [Regoli, Giuliani, 2014]. Также медь имеет высокое сродство к тиольным группам белков и оказывает ингибирующее действие на различные

ферменты, что приводит к негативным последствиям на клеточном уровне. Оба эти свойства меди в первую очередь должны отражаться на показателях работы антиоксидантной системы (АОС), в том числе активности ферментов GST и CAT. Например, у морских беспозвоночных *Ruditapes decussates* [Geret et al., 2002] и *M. galloprovincialis* [Canesi et al., 1998] под воздействием меди (0–25 и 60 мкг/л соответственно) изменялась активность антиоксидантных ферментов, таких как SOD, CAT и GPx. В жабрах моллюсков после 1, 3, 7, 14, 21 и 28 дней воздействия Cu отмечались индукция металлотионеинов и увеличение малонового диальдегида – продукта перекисного окисления липидов. Металлотионеины являются основным механизмом детоксикации микроэлементов (включая Cu) у животных [Wang, Rainbow, 2010]. Они связывают свободные металлы, тем самым снижая их внутриклеточные концентрации и предотвращая нежелательные взаимодействия с другими клеточными компонентами [Klaassen et al., 1999; Wang, Rainbow, 2010].

У *M. galloprovincialis* при действии меди в концентрации 40 мкг/л также обнаружено усиление интенсивности перекисного окисления липидов [Viarengo et al., 1993] и изменения в содержании низкомолекулярного антиоксиданта – тиолсодержащего пептида глутатиона [Regoli, Principato, 1995]. У мидий *Mytilus edulis* после кратковременного воздействия меди в той же концентрации обнаружили изменение транскрипции другого низкомолекулярного тиолсодержащего пептида металлотионеина [Dondero et al., 2005; Zorita et al., 2007].

Известно, что у моллюсков медь в первую очередь накапливается в пищеварительной железе [Marigómez et al., 2002]. На рис. 2 представлены графики изменения активности GST и CAT и содержания GSH в гепатопанкреасе беззубки через 1, 3 и 7 суток от начала эксперимента по добавлению в аквариумы разных концентраций меди.

Спустя сутки после начала воздействия достоверные изменения выявлены в содержании восстановленного глутатиона. Его концентрация в гепатопанкреасе понижалась по сравнению с контрольными значениями при действии 50 и 250 мкг/л меди. Данные изменения, вероятно, вызваны связыванием меди с SH-группами GSH, что является одним из основных механизмов обезвреживания тяжелых металлов в клетке. Уже на третьи сутки воздействия воды с добавлением 50 и 100 мкг/л меди наблюдалось повышение уровня GSH, вероятно, за счет компенсаторного усиления синтеза этого пептида. Изменение уровня GSH в гепатопанкреа-

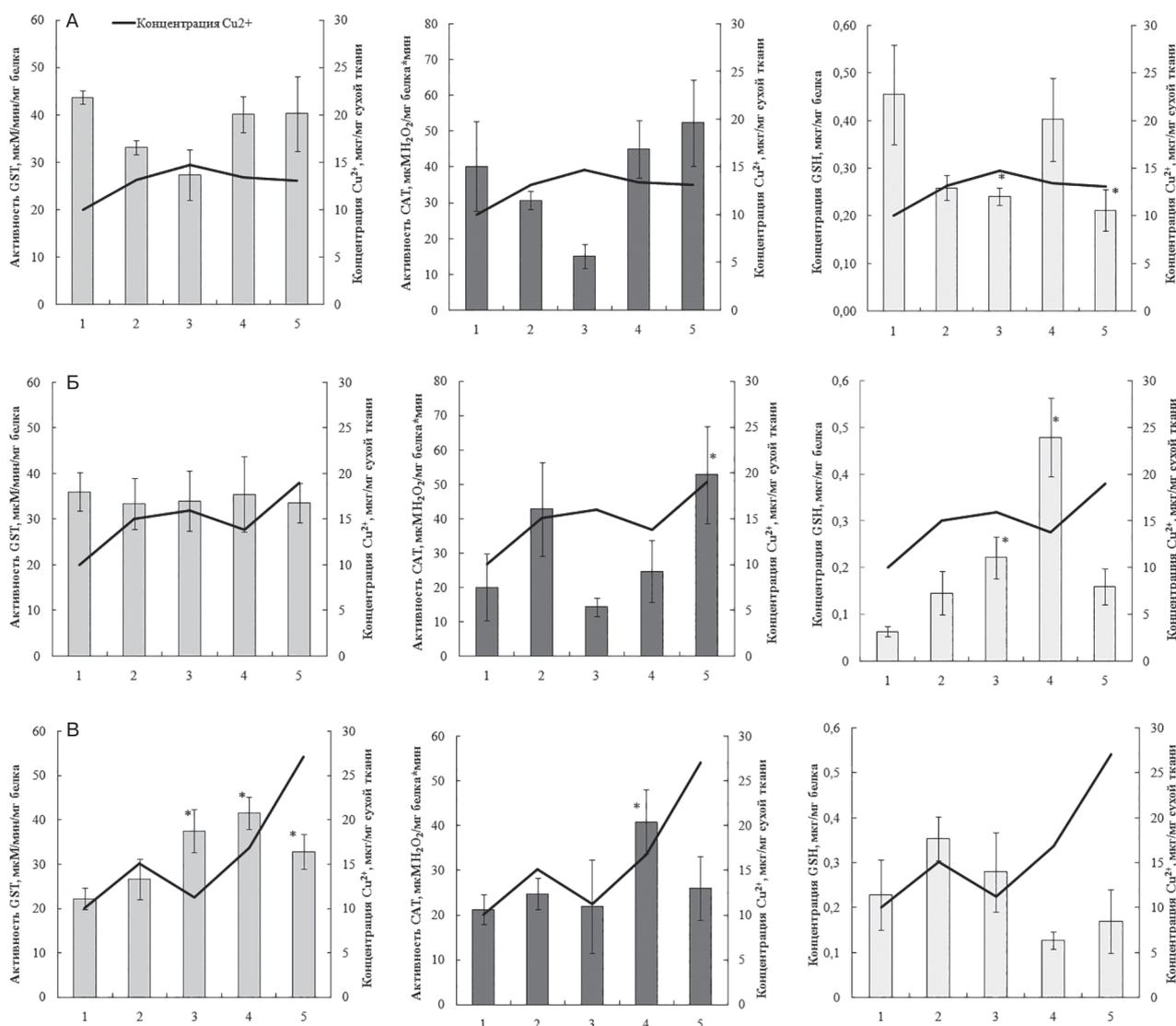


Рис. 2. Активность глутатион-S-трансферазы и каталазы и концентрация GSH в гепатопанкреасе двусторчатых моллюсков *A. cygnea* при добавлении соли меди (II) с экспозицией опыта 1 (А), 3 (Б) и 7 (В) суток:

по оси абсцисс: маркировка аквариума в зависимости от количества добавленной меди (1 – 0, 2 – 5, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 250 мкг/л); * – статистически значимые различия по отношению к моллюскам из аквариума 1

Fig. 2. Activity of glutathione-S-transferase and catalase and GSH concentration in the hepatopancreas of the mussels *A. cygnea* in the presence of copper (II) salt with an exposure of 1 (A), 3 (Б), and 7 (B) days:

along the abscissa: marking of the aquarium depending on the amount of added copper (1 – 0, 2 – 5, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 250 µg/l); * – statistically significant differences in relation to the mussels from aquarium 1

се уже через сутки от начала эксперимента подтверждает участие этого трипептида в первом эшелоне защиты от тяжелых металлов.

Активность GST на первые и третьи сутки оставалась на уровне контроля во всех аквариумах. Известно, что отсутствие повышения активности GST в пищеварительной железе при действии металла (рис. 2, А, Б) может быть связано с ингибированием GR либо с транскрипцией гена GST- π [Hoarau et al., 2006]. На седьмые сутки наблюдали активацию этого фермента в пищеварительной железе моллю-

сков из аквариумов, в которые добавляли медь в концентрации 50, 100 и 250 мкг/л по сравнению с аквариумом № 1 (0 мкг/л Cu^{2+}) (рис. 2, В).

Активность CAT в пищеварительной железе беззубок также не изменялась при низких концентрациях меди в воде по сравнению с моллюсками из контроля, и только при самой высокой из протестированных концентраций и длительной экспозиции (250 мкг/л на 3-и сутки и 100 мкг/л на 7-е сутки) активность этого фермента повышалась. Кроме того, можно отметить снижение активности CAT на 7-е сутки

у моллюсков из аквариума, в который добавляли 250 мкг/л ионов меди, по сравнению с животными из этой же группы через 1 и 3 суток. Снижение активности САТ у моллюсков может быть следствием структурных изменений белков, в том числе самого фермента [Yan et al., 2007].

Таким образом, длительное воздействие повышенных концентраций меди приводит к адаптивному изменению активности ферментов АОЗ у беззубки, направленному на обезвреживание продуктов окислительных реакций. При этом такой ответ занимает довольно много времени, так как требует синтеза новых молекул белка, который происходит через регуляцию активности соответствующих генов.

Заключение

В целом изменения параметров исследованных компонентов АОС можно охарактеризовать как умеренные. Статистический анализ не выявил достоверных корреляций между концентрациями меди в воде и изменениями в активности GST и САТ и концентрацией GSH. Показано, что ионы меди в небольших количествах (на один-два порядка ниже ПДК) не оказывают индуцирующего действия на компоненты АОС и базальный уровень антиоксидантов (САТ, GST и GSH) оказался достаточным для обезвреживания производных метаболизма меди.

Показано, что при воздействии концентраций меди в воде в диапазоне, характерном для большинства природных пресноводных водоемов России (1–100 мкг/л), происходит очень медленное накопление меди в тканях *A. sуглеа*.

В свою очередь, накопление металла в концентрациях, превышающих фоновые значения, со временем линейно возрастает. Таким образом, скорость накопления увеличивается с повышением концентрации загрязнителя, что потенциально создает угрозу не только для самих моллюсков, но и для консументов, находящихся выше по пищевой цепи, в том числе для человека. Изменения в активности ферментов АОС (САТ и GST) были отмечены в основном на седьмые сутки эксперимента при самых высоких из протестированных концентрациях меди. Отмеченные на 7-е сутки изменения активности ферментов при концентрации Cu^{2+} 250 мкг/л позволяют предположить, что более длительное действие меди, даже в концентрациях ниже установленного ПДК для водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования (ПДК_{вп}) и в 100 раз выше ПДК_{вп}, обладает кумулятивным эффектом, который в дальнейшем может иметь негативные последствия.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0076) и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-01431_а.

Литература

Государственный доклад «О состоянии и использовании водных ресурсов Российской Федерации в 2017 году». М.: НИИ-Природа, 2018. 298 с.

Даувальтер В. А., Кашулин Н. А. Изменение концентраций никеля и меди в поверхностных слоях донных отложений оз. Имандра за последние полвека // Вестник МГТУ. 2015. Т. 18, № 2. С. 307–321.

Лукьянова О. Н. Молекулярные биомаркеры. Владивосток: ДВГАЭУ, 2001. 196 с.

Мишукова Т. Г., Осипов А. А., Сальников И. А. Определение содержания микроэлементов в питьевых водах Оренбургской области // Вестник Оренбургского гос. университета. 2015. Т. 10, № 185. С. 303–307

Моисеенко Т. И., Кудрявцева Л. Н., Гашкина Н. А. Рассеянные элементы в поверхностных водах суши: технофильность, биоаккумуляция и экотоксикология. М.: Наука, 2006. 261 с.

Озера Карелии: Справочник / Ред. Н. Н. Филатов, В. И. Кухарев. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2013. 464 с.

Приказ от 13 декабря 2016 года № 552 «Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 12 октября 2018 года)» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации // Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации [Электронный ресурс]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/420389120> (дата обращения 15.11.2019).

Слуковский З. И. Нормирование по литию концентраций тяжелых металлов в донных отложениях озер Ладожское и Четырехверстное (Республика Карелия) // Химия в интересах устойчивого развития. 2015. Т. 23, № 4. С. 397–408. doi: 10.15372/KhUR20150409

Слуковский З. И., Полякова Т. Н. Анализ накопления тяжелых металлов в организме олигохет из речных донных отложений урбанизированной среды // Биология внутренних вод. 2017. № 3. С. 73–82. doi: 10.7868/S032096521703010X

Суховская И. В., Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Немова Н. Н. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200–220 нм и по Брэдфорд // Труды КарНЦ РАН. 2010. № 2. С. 68–71.

Чуйко Г. М. Биомаркеры в гидроэкологической: принципы, методы и методология, практика использования // Экологический мониторинг. Ч. VIII. Современные проблемы мониторинга пресноводных экосистем: учебное пособие / Ред. Д. Б. Гелашви-

ли, Г. В. Шурганова. Нижний Новгород: ННГУ, 2014. С. 309–326.

Шилова Н. А. Влияние тяжелых металлов на представителей пресноводного фито- и зоопланктона в условиях засоления: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2014. 133 с.

Ahsanullah M., Williams A. R. Sublethal effects and bioaccumulation of cadmium, chromium, copper and zinc in the marine amphipod *Allorchestes compressa* // Mar. Biol. 1991. Vol. 108. P. 59–65. doi: 10.1007/BF01313471

Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // Biol. Chem. 1952. Vol. 195, no. 1. P. 133–140.

Cajaraville M. P., Bebianno M. J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach // Sci. Total. Environ. 2000. Vol. 247, no. 2–3. P. 295–311. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00499-4

Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G., Gallo G. Bivalve mollusks as a unique target group for nanoparticle toxicity // Mar. Environ. Res. 2012. Vol. 76. P. 16–21. doi: 10.1016/j.marenvres.2011.06.005

Canesi L., Malatesta M., Battistelli S., Gallo G., Gazzanelli G. Identification of epidermal growth factor receptors by immunoelectron microscopy in isolated mussel digestive gland cells // Abstracts 19th Conference of European Comparative Endocrinologists (Nijmegen, The Netherlands, September 1–5, 1998).

Chapman P. M. Environmental risks of inorganic metals and metalloids: A continuing, evolving scientific odyssey // Human Ecol. Risk Assess. 2008. Vol. 14, no. 1. P. 5–40. doi: 10.1080/10807030701790272

Conradi M., Depledge M. H. Population responses of the marine amphipod *Corophiumvolutator* (Pallas, 1766) to copper // Aquat. Toxicol. 1998. Vol. 44. P. 31–45. doi: 10.1016/S0166-445X(98)00069-1

Cosson R. P., Thiébaud E., Company R., Castrec-Rouelle M., Colaço A., Martins I., Sarradin P. M., Bebianno M. J. Spatial variation of metal bioaccumulation in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* // Mar. Environ. Res. 2008. Vol. 65, no. 5. P. 405–415. doi: 10.1016/j.marenvres.2008.01.005

Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council // Official J. of the European Union. 2008. Vol. L 348. P. 84–97.

Dondero F., Piacentini L., Banni M., Rebelo M., Burlando B., Viarengo A. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation // Gene. 2005. Vol. 345, no. 2. P. 259–270. doi: 10.1016/j.gene.2004.11.031

Duffus J. H. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report) // Pure Appl. Chem. 2002. Vol. 74, no. 5. P. 793–807.

Foster-Smith R. L. The effect of concentration of suspension of the filtration rates and pseudofaecal pro-

duction for *Mytilus edulis* L., *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1975. Vol. 17. P. 1–22. doi: 10.1016/0022-0981(75)90075

George S. G., Coombs T. L., Pirie B. J. S. Characterization of metal-containing granules from the kidney of the common mussel, *Mytilus edulis* // Biochim. Biophys. Acta (BBA) – General Subjects. 1982. Vol. 716, no. 1. P. 61–71. doi: 10.1016/0304-4165(82)90203-3

George S. G., Pirie B. J. S., Coombs T. L. The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1976. Vol. 23, no. 1. P. 71–84. doi: 10.1016/0022-0981(76)90086-1

Geret F., Serafim A., Barreira L., Bebianno M. J. Effects of cadmium on anti-oxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam, *Ruditapes decussates* // Biomarkers. 2002. Vol. 7, no. 3. P. 242–256.

Guéguen M., Amiard J. C., Arnich N., Badot P. M., Claisse D., Guérin T., Vernoux J. P. Shellfish and residual chemical contaminants: hazards, monitoring, and health risk assessment along French coasts // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2011. Vol. 213. P. 55–111. doi: 10.1007/978-1-4419-9860-6_3

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130–7139.

Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Anal. Biochem. 1976. Vol. 74, no. 1. P. 214–226.

Hoarau P., Damiens G., Roméo M., Gnassia-Barelli M., Bebianno M. J. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution // Comp. Biochem. Physiol. 2006. Vol. 143. P. 196–203.

Huggett R. J., Kimerle R. A., Mehrle P. M., Bergman H. L. Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. FL, Boca Raton: Lewis Publ., 1992.

Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1999. Vol. 39. P. 267–294.

Larsen B. K., Pörtner H. O., Jensen F. B. Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper // Mar. Biol. 1997. Vol. 128. P. 337–346. doi: 10.1007/s002270050099

Lyons B. P., Thain J. E., Stentiford G. D., Hylland K., Davies I. M., Vethaak A. D. Using biological effects tools to define Good Environmental Status under the European Union Marine Strategy Framework Directive // Mar. Pollut. Bull. 2010. Vol. 60, no. 10. P. 1647–1651. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.06.005

Lysenko L., Sukhovskaya I., Borvinskaya E., Krupnova M., Kantserova N., Bakhmet I., Nemova N. Detoxification and protein quality control markers in the mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus) exposed to crude oil: Salinity-induced modulation // Estuar. Coast. Shelf Sci. 2015. Vol. 167. P. 220–227.

March F. A., Dwyer F. J., Augspurger T., Ingersoll C. G., Wang N., Mebane C. A. An evaluation

of freshwater mussel toxicity data in the derivation of water quality guidance and standards for copper // *Environ. Toxicol. Chem.* 2007. Vol. 26. P. 2066–2074. doi: 10.1897/06-560R.1

Marigomez I., Soto M., Cajaraville M. P., Angulo E., Giamberini L. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs // *Microsc. Res. Tech.* 2002. Vol. 56. P. 358–392. doi: 10.1002/jemt.10040

Noble J. E., Bailey M. A. Quantitation of protein // *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 463. P. 73–95. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1

Parry H. E., Pipe R. K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*) // *Aquat. Toxicol.* 2004. Vol. 69. P. 311–325. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.06.003

Perić L., Nerlović V., Žurga P., Žilić L., Ramšak A. Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals // *Chemosphere.* 2017. Vol. 174. P. 554–562. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.138

Radenac G., Miramand P., Tardy J. Search for impact of a dredged material disposal site on growth and metal contamination of *Mytilus edulis* L. in Charente Maritime (France) // *Mar. Pollut. Bull.* 1997. Vol. 34. P. 721–729. doi: 10.1016/S0025-326X(97)00011-8

Rao D. G. V. P., Khan M. A. Q. Zebra mussels: Enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism // *Water Environ. Res.* 2000. Vol. 72. P. 175–178. doi: 10.2175/106143000X137257

Regoli F., Giuliani M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms // *Mar. Environ. Res.* 2014. Vol. 93. P. 106–117. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.07.006

Regoli F., Principato G. Glutathione, Glutathione-Dependant and Antioxidant Enzymes in Mussel, *Mytilus Galloprovincialis* Exposed to Metals in Different Field and Laboratory Condition. Implications for a Proper Use of Biochemical Markers // *Aquatic Toxicology.* 1995. Vol. 31. P. 143–164. doi: 10.1016/0166-445X(94)00064-W

Sinicropi M. S., Amantea D., Caruso A., Saturnino C. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning // *Arch. Toxicol.* 2010. Vol. 84, no. 7. P. 501–520. doi: 10.1007/s00204-010-0544-6

Syversen T., Kaur P. The toxicology of mercury and its compounds // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2012. Vol. 26, no. 4. P. 215–226. doi: 10.1016/j.jtemb.2012.02.004

Sze P. W. C., Lee S. Y. Effects of chronic copper exposure on the green mussel *Perna viridis* // *Mar. Biol.* 2000. Vol. 137. P. 379–392. doi: 10.1007/s002270000350

Sze P. W. C., Lee S. Y. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann) // *Marine Pollution Bull.* 1995. Vol. 31, no. 4–12. P. 390–393. doi: 10.1016/0025-326X(95)00140-1

Vega-López A., Ayala-López G., Posadas-Espadas B. P., Olivares-Rubio H. F., Dzul-Caamal R. Relations of oxidative stress in freshwater phytoplankton with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2013. Vol. 165, no. 4. P. 498–507. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.01.026

Viarengo A., Mancinelli G., Pertica M., Fabbri R., Orunesu M. Effects of heavy metals on the Ca (2+) – ATPase activity present in gill cell plasma-membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) // *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1993. Vol. 106, no. 3. P. 655–660. doi: 10.1016/0742-8413(93)90223-8

Viarengo A., Pertica M., Mancinelli G., Burlando B., Canesi L., Orunesu M. In vivo effects of copper on the calcium homeostasis mechanisms of mussel gill cell plasma membranes // *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1996. Vol. 113. P. 421–425. doi: 10.1016/0742-8413(96)00004-7

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 // *Aquat. Toxicol.* 2012. Vol. 15, no. 106–107. P. 1–8. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.10.001

Wang N., Ingersoll C. G., Greer I. E., Hardesty D. K., Ivey C. D., Kunz J. L., Brumbaugh W. G., Dwyer F. J., Roberts A. D., Augspurger T., Kane C. M., Neves R. J., Barnhart M. C. Chronic toxicity of copper and ammonia to juvenile freshwater mussels (Unionidae) // *Environ. Toxicol. Chem.* 2007. Vol. 26. P. 2048–2056. doi: 10.1897/06-524R.1

Wang W.-X., Rainbow P. S. Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals // *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2010. Vol. 152. P. 1–8.

Wang W. X., Pan K., Tan Q. G., Guo L., Simpson C. L. Estuarine pollution of metals in China: science and mitigation // *Environ. Sci. Technol.* 2014. Vol. 48. P. 9975–9976.

Yan B., Wang L., Li Y., Liu N., Wang Q. Effects of cadmium on hepatopancreatic antioxidant enzyme activity in freshwater crab (*Sinopotamon yangtsekiense*) // *Acta Zool. Sin.* 2007. Vol. 53(6). P. 1121–1128.

Zorita I., Bilbao E., Schad A., Cancio I., Soto M., Cajaraville M. P. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007. Vol. 220, no. 2. P. 186–196.

Поступила в редакцию 04.11.2019

References

Chuiko G. M. Biomarkery v gidroekotoksikologii: printsipy, metody i metodologiya, praktika ispol'zovaniya [Biomarkers in hydroecotoxicology: principles,

methods and methodology, practice of use]. *Ekol. monitoring.* Ch. VIII. Sovr. probl. monitoringa presnovodnykh ekosistem: ucheb. posobie [Ecol. monitoring.

Part VIII. Current probl. of monitoring freshwater ecosystems: A Study guide]. Nizhnii Novgorod: NNGU, 2014. P. 309–326.

Dauval'ter V. A., Kashulin N. A. Izmenenie kontsentratsii nikelya i medi v poverkhnostnykh sloyakh donnykh otlozhenii oz. Imandra za poslednie polveka [Changes in concentrations of nickel and copper in the surface layers of sediments of Lake Imandra for the last half century]. *Vestnik MGTU [Vestnik MSTU]*. 2015. Vol. 18, no. 2. P. 307–321.

Gosudarstvennyi doklad "O sostoyanii i ispol'zovanii vodnykh resursov Rossiiskoi Federatsii v 2017 godu" [State report 'On the state and use of water resources of the Russian Federation in 2017']. Moscow: NIA-Priroda, 2018. 298 p.

Luk'yanova O. N. Molekulyarnye biomarkery [Molecular biomarkers]. Vladivostok: DVGAEU, 2001. 196 p.

Mishukova T. G., Osipov A. A., Sal'nikov I. A. Opreделение soderzhaniya mikroelementov v pit'evykh vodakh Orenburgskoi oblasti [Determination of trace elements in drinking waters of the Orenburg Region]. *Vestnik Orenburgskogo gos. univ.* [Proceed. Orenburg St. Univ.]. 2015. Vol. 10, no. 185. P. 303–307.

Moiseenko T. I., Kudryavtseva L. N., Gashkina N. A. Rasseyannye elementy v poverkhnostnykh vodakh su-shii: tekhnofil'nost', bioakkumulyatsiya i ekotoksikologiya [Scattered elements in surface land waters: Technophilicity, bioaccumulation, and ecotoxicology]. Moscow: Nauka, 2006. 261 p.

Ozera Karelii: Spravochnik [Lakes of Karelia: A Reference book]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2013. 464 p.

Prikaz ot 13 dekabrya 2016 goda N 552 "Ob utverzhdenii normativov kachestva vody vodnykh ob'ektov rybokhozyaistvennogo znacheniya, v tom chisle normativov predel'no dopustimyykh kontsentratsii vrednykh veshchestv v vodakh vodnykh ob'ektov rybokhozyaistvennogo znacheniya (s izmeneniyami na 12 oktyabrya 2018 goda)" [Order No. 552 of December 13, 2016 'On approval of water quality standards for fishery water bodies, including maximum permissible concentrations of harmful substances in the waters of fishery water bodies (as amended on October 12, 2018)']. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. *Elektronnyi fond pravovoi inormativno-tekhnicheskoi dokumentatsii* [Electronic fund of legal and regulatory technical documentation]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/420389120> (accessed: 15.11.2019).

Slukovskii Z. I. Normirovanie po litiyu kontsentratsii tyazhelykh metallov v donnykh otlozheniyakh ozer Ladozhskoe i Chetyrekhverstnoe (Respublika Kareliya) [Normalization of the concentrations of heavy metals with respect to lithium in bottom sediments of Lakes Ladoga and Chetyrekhverstnoye (Republic of Karelia)]. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya* [Chemistry for Sustainable Development]. 2015. Vol. 23, no. 4. P. 397–408. doi: 10.15372/KhUR20150409

Slukovskii Z. I., Polyakova T. N. Analiz nakopleniya tyazhelykh metallov v organizme oligokhet iz rechnykh donnykh otlozhenii urbanizirovannoi sredy [Analysis of accumulation of heavy metals from river bottom sediments of the urban environment in the bodies of oligochaetes]. *Biol. vnutr. vod* [Inland Water Biol.]. 2017. Vol. 3. P. 73–82. doi: 10.7868/S032096521703010X

Sukhovskaya I. V., Borvinskaya E. V., Smirnov L. P., Nemova N. N. Sravnitel'nyi analiz metodov opredele-niya kontsentratsii belka – spektrofotometrii v diapazone 200–220 nm i po Bredford [Comparative analysis of the methods for determining protein concentration – spectrophotometry in the 200–220 nm range and the Bradford protein assay]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2010. Vol. 2. P. 68–71.

Shilova N. A. Vliyanie tyazhelykh metallov na predstavitelei presnovodnogo fito- i zooplanktona v usloviyakh zasoleniya [Effect of metal concentration on freshwater phyto – and zooplankton under salinization conditions]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Saratov, 2014. 133 p.

Ahsanullah M., Williams A. R. Sublethal effects and bioaccumulation of cadmium, chromium, copper and zinc in the marine amphipod *Allorchestes compressa*. *Mar. Biol.* 1991. Vol. 108. P. 59–65. doi: 10.1007/BF01313471

Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Biol. Chem.* 1952. Vol. 195, no. 1. P. 133–140.

Cajaraville M. P., Bebianno M. J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total. Environ.* 2000. Vol. 247, no. 2–3. P. 295–311. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00499-4

Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G., Gallo G. Bivalve mollusks as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 2012. Vol. 76. P. 16–21. doi: 10.1016/j.marenvres.2011.06.005

Canesi L., Malatesta M., Battistelli S., Gallo G., Gazzanelli G. Identification of epidermal growth factor receptors by immunoelectron microscopy in isolated mussel digestive gland cells. *Abstracts 19th Conference of European Comparative Endocrinologists* (Nijmegen, The Netherlands, September 1–5, 1998).

Chapman P. M. Environmental risks of inorganic metals and metalloids: A continuing, evolving scientific odyssey. *Human Ecol. Risk Assess.* 2008. Vol. 14, no. 1. P. 5–40. doi: 10.1080/10807030701790272

Conradi M., Depledge M. H. Population responses of the marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) to copper. *Aquat. Toxicol.* 1998. Vol. 44. P. 31–45. doi: 10.1016/S0166-445X(98)00069-1

Cosson R. P., Thiébaud E., Company R., Castrec-Rouelle M., Colaço A., Martins I., Sarradin P. M., Bebianno M. J. Spatial variation of metal bioaccumulation in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 2008. Vol. 65, no. 5. P. 405–15. doi: 10.1016/j.marenvres.2008.01.005

Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Official J. of the European Union*. 2008. Vol. L 348. P. 84–97.

Dondero F., Piacentini L., Banni M., Rebelo M., Burlando B., Viarengo A. Quantitative PCR analysis of two

molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*. 2005. Vol. 345, no. 2. P. 259–270. doi: 10.1016/j.gene.2004.11.031

Duffus J. H. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 2002. Vol. 74, no. 5. P. 793–807.

Foster-Smith R. L. The effect of concentration of suspension of the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* L., *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1975. Vol. 17. P. 1–22. doi: 10.1016/0022-0981(75)90075

George S. G., Coombs T. L., Pirie B. J. S. Characterization of metal-containing granules from the kidney of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – General Subjects*. 1982. Vol. 716, no. 1. P. 61–71. doi: 10.1016/0304-4165(82)90203-3

George S. G., Pirie B. J. S., Coombs T. L. The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1976. Vol. 23, no. 1. P. 71–84. doi: 10.1016/0022-0981(76)90086-1

Geret F., Serafim A., Barreira L., Bebianno M. J. Effects of cadmium on anti-oxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam, *Ruditapes decussates*. *Biomarkers*. 2002. Vol. 7, no. 3. P. 242–256.

Guéguen M., Amiard J. C., Arnich N., Badot P. M., Claisse D., Guérin T., Vernoux J. P. Shellfish and residual chemical contaminants: hazards, monitoring, and health risk assessment along French coasts. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2011. Vol. 213. P. 55–111. doi: 10.1007/978-1-4419-9860-6_3

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130–7139.

Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 74, no. 1. P. 214–226.

Hoarau P., Damiens G., Roméo M., Gnassia-Barelli M., Bebianno M. J. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 143. P. 196–203.

Huggett R. J., Kimerle R. A., Mehrle P. M., Bergman H. L. Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. FL, Boca Raton: Lewis Publ., 1992.

Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999. Vol. 39. P. 267–294.

Larsen B. K., Pörtner H. O., Jensen F. B. Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. *Mar. Biol.* 1997. Vol. 128. P. 337–346. doi: 10.1007/s002270050099

Lyons B. P., Thain J. E., Stentiford G. D., Hylland K., Davies I. M., Vethaak A. D. Using biological effects tools to define Good Environmental Status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.* 2010. Vol. 60, no. 10. P. 1647–51. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.06.005

Lysenko L., Sukhovskaya I., Borvinskaya E., Krupnova M., Kantserova N., Bakhmet I., Nemova N. Detoxification and protein quality control markers in the mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus) exposed to crude oil: Salinity-induced modulation. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2015. Vol. 167. P. 220–227.

March F. A., Dwyer F. J., Augspurger T., Ingersoll C. G., Wang N., Mebane C. A. An evaluation of freshwater mussel toxicity data in the derivation of water quality guidance and standards for copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 2007. Vol. 26. P. 2066–2074. doi: 10.1897/06-560R.1

Marigomez I., Soto M., Cajaraville M. P., Angulo E., Giamberini L. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 2002. Vol. 56. P. 358–392. doi: 10.1002/jemt.10040

Noble J. E., Bailey M. A. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 463. P. 73–95. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1

Parry H. E., Pipe R. K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 2004. Vol. 69. P. 311–325. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.06.003

Perić L., Nerlović V., Žurga P., Žilić L., Ramšak A. Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere*. 2017. Vol. 174. P. 554–562. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.138

Radenac G., Miramand P., Tardy J. Search for impact of a dredged material disposal site on growth and metal contamination of *Mytilus edulis* L. in Charente Maritime (France). *Mar. Pollut. Bull.* 1997. Vol. 34. P. 721–729. doi: 10.1016/S0025-326X(97)00011-8

Rao D. G. V. P., Khan M. A. Q. Zebra mussels: Enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. *Water Environ. Res.* 2000. Vol. 72. P. 175–178. doi: 10.2175/106143000X137257

Regoli F., Giuliani M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 2014. Vol. 93. P. 106–117. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.07.006

Regoli F., Principato G. Glutathione, Glutathione-Dependant and Antioxidant Enzymes in Mussel, *Mytilus Galloprovincialis* Exposed to Metals in Different Field and Laboratory Condition. Implications for a Proper Use of Biochemical Markers. *Aquatic Toxicology*. 1995. Vol. 31. P. 143–164. doi: 10.1016/0166-445X(94)00064-W

Sinicropi M. S., Amantea D., Caruso A., Saturnino C. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Arch. Toxicol.* 2010. Vol. 84, no. 7. P. 501–20. doi: 10.1007/s00204-010-0544-6

Syversen T., Kaur P. The toxicology of mercury and its compounds. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2012. Vol. 26, no. 4. P. 215–26. doi: 10.1016/j.jtemb.2012.02.004

Sze P. W. C., Lee S. Y. Effects of chronic copper exposure on the green mussel *Perna viridis*.

Mar. Biol. 2000. Vol. 137. P. 379–392. doi: 10.1007/s002270000350

Sze P. W. C., Lee S. Y. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Marine Pollution Bull.* 1995. Vol. 31, no. 4–12. P. 390–393. doi: 10.1016/0025-326X(95)00140-1

Vega-López A., Ayala-López G., Posadas-Espadas B. P., Olivares-Rubio H. F., Dzul-Caamal R. Relations of oxidative stress in freshwater phytoplankton with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2013. Vol. 165, no. 4. P. 498–507. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.01.026

Viarengo A., Mancinelli G., Pertica M., Fabbri R., Orunesu M. Effects of heavy metals on the Ca (2+) – ATPase activity present in gill cell plasma-membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 1993. Vol. 106, no. 3. P. 655–660. doi: 10.1016/0742-8413(93)90223-8

Viarengo A., Pertica M., Mancinelli G., Burlando B., Canesi L., Orunesu M. In vivo effects of copper on the calcium homeostasis mechanisms of mussel gill cell plasma membranes. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 1996. Vol. 113. P. 421–425. doi: 10.1016/0742-8413(96)00004-7

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. *Aquat. Toxicol.* 2012. Vol. 15, no. 106–107. P. 1–8. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.10.001

Wang N., Ingersoll C. G., Greer I. E., Hardesty D. K., Ivey C. D., Kunz J. L., Brumbaugh W. G., Dwyer F. J., Roberts A. D., Augspurger T., Kane C. M., Neves R. J., Barnhart M. C. Chronic toxicity of copper and ammonia to juvenile freshwater mussels (Unionidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 2007. Vol. 26. P. 2048–2056. doi: 10.1897/06-524R.1

Wang W. X., Pan K., Tan Q. G., Guo L., Simpson C. L. Estuarine pollution of metals in China: science and mitigation. *Environ. Sci. Technol.* 2014. Vol. 48. P. 9975–9976.

Wang W.-X., Rainbow P. S. Significance of metallo-thioneins in metal accumulation kinetics in marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2010. Vol. 152. P. 1–8.

Yan B., Wang L., Li Y., Liu N., Wang Q. Effects of cadmium on hepatopancreatic antioxidant enzyme activity in freshwater crab (*Sinopotamon yangtsekiense*). *Acta Zool. Sin.* 2007. Vol. 53(6). P. 1121–1128.

Zorita I., Bilbao E., Schad A., Cancio I., Soto M., Cajaraville M. P. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007. Vol. 220, no. 2. P. 186–196.

Received November 04, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Суховская Ирина Викторовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sukhovskaya@inbox.ru
тел.: (8142) 769810

Курпе Станислав Ремасо

студент
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Россия, 185910
эл. почта: mvteam7@gmail.com

Борвинская Екатерина Витальевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: katsu@inbox.ru

Кочнева Альбина Александровна

аспирант
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kochnevaalbina@gmail.com

CONTRIBUTORS:

Sukhovskaya, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: sukhovskaya@inbox.ru
tel.: (8142) 769810

Kurpe, Stanislav Remaso

Petrozavodsk State University
33 Lenin Ave., 185910 Petrozavodsk, Russia
e-mail: mvteam7@gmail.com

Borvinskaya, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: katsu@inbox.ru

Kochneva, Albina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: kochnevaalbina@gmail.com

Фокина Наталья Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: fokinann@gmail.com

Fokina, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: fokinann@gmail.com