

УДК УДК 57.02

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИИ ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS* К КАДМИЮ

ЖУКОВСКАЯ
Авианна Фаязовна

ТОИ ДВО РАН, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43,
aviannaZh@gmail.com

СЛИНЬКО
Елена Николаевна

ТОИ ДВО РАН, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43,
aviannaZh@gmail.com

ЧЕЛОМИН
Виктор Павлович

ТОИ ДВО РАН, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43,
chelomin@poi.dvo.ru

Ключевые слова:
МТ-подобные белки
тяжелые металлы
токсичность
двустворчатые моллюски.
адаптация

Аннотация: Дальневосточный представитель двустворчатых моллюсков приморский гребешок *Mizuhopecten yessoensis* способен накапливать кадмий в мягких тканях без какого-либо видимого патологического эффекта даже в тех местах обитания, где кадмий не превышает фоновых значений. Данная уникальная особенность обусловлена наличием, по крайней мере в пищеварительной железе, у взрослых (5-7-летних) особей двух высокомолекулярных МТ-подобных белков. В данном исследовании рассмотрены возрастные особенности накопления и распределения кадмия в пищеварительной железе приморского гребешка *M. yessoensis*. Рассмотрены три возрастные группы: годовалые, двухлетние и трехлетние представители данного вида. В ходе эксперимента по накоплению кадмия (300 мкг/мл CdCl₂) удалось найти разновозрастные особенности в аккумуляции тяжелого металла в ткани пищеварительной железы *M. yessoensis*. Найдено, что в годовых особях за аккумуляцию кадмия в пищеварительной железе отвечает МТ-подобный кадмий-связывающий белок 120 кДа, тогда как к стадии половозрелости (3 года) данный белок прекращает синтезироваться и основным кадмий-связывающим белком становится МТ-подобный белок с молекулярной массой 72 кДа.

© Петрозаводский государственный университет

Рецензент: И. Н. Бахмет

Получена: 04 марта 2019

Подписана к печати: 19 июня 2019 года

Введение

Приморский гребешок *Mizuhopecten yessoensis* – двустворчатый моллюск, представитель семейства Pectinidae, обитает в водах Японского моря. Данный вид является уникальным объектом благодаря его способности накапливать кадмий в мягких тканях даже в тех местах обитания, где кадмий не превышает фоновых значений (Chelomin, Belcheva, 1991; Chelomin et al., 1995).

Феномен устойчивости к кадмию хорошо известен в мировой литературе и объясняется функционированием в тканях специальных кадмий-связывающих белков металлотионеинов (МТ). Металлотионеины – это класс низкомолекулярных белков (6–7 кДа), которые найдены у млекопитающих. Эти белки, в аминокислотном составе которых присутствует до 30 % цистеина, относятся к классическим МТ. Синтез данного типа белков индуцируется при поступлении в организм как жизненно необходимых Cu и Zn, так и в ответ на поступление Cd, Hg и ряда других токсичных металлов. Однако широкое распространение металлотионеинов не означает, что это единственная группа белков, участвующих в связывании и детоксикации металлов, и прежде всего кадмия. У некоторых организмов были обнаружены различные Cd-связывающие белки с вариациями в молекулярной массе, количестве цистеина и аминокислотном составе в целом. Подобные характеристики не позволяют отнести эти белки к МТ классического типа, и поэтому они получили название МТ-подобные белки (Ponzano, 2001; Stone, 1986; Uthe, Chou, 1987).

Ранее наамибылоустановлено (Zhukovskaya et al., 2012), что в пищеварительной железе взрослых особей (5–7 лет) приморского гребешка *M. yessoensis* за связывание кадмия отвечают два МТ-подобных белка с молекулярной массой 72 и 43 кДа. Цель данной работы – выявить особенности адаптации годовых, двух- и трехлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* к кадмию.

Материалы

Особи приморского гребешка *M. yessoensis* были отобраны из акватории бухты Северная (42° 93' N, 131° 40' E) залива Петра Великого Японского моря, с территории марикультурного хозяйства (рис. 1) в июне. Были взяты три группы гребешков: одно-, двух- и трехлетние особи. Каждая возрастная выборка состояла из 40 особей. После отлова моллюсков транспортировали в аквариумы для

проведения эксперимента по накоплению кадмия.

Особей *M. yessoensis* перед экспериментом в течение 7 дней подвергали процессу адаптации в аквариумах с аэрируемой проточной водой и сохранением постоянной температуры 17 °C. После адаптации были отобраны контрольные гребешки (20 шт.) каждого возраста, остальным в среду добавляли 300 мкг/л CdCl₂. Инкубацию проводили в течение 10 дней с ежедневной сменой воды.

Методы

После эксперимента по инкубации *M. yessoensis* с кадмием проводили дальнейшие биохимические исследования. Выделение МТ-подобных кадмий-связывающих белков проводили согласно методике выделения МТ, разработанной для морских беспозвоночных (Roesijadi et al., 1989; Thompson, Sutherland, 1992).

Из особей приморского гребешка *M. yessoensis* на льду извлекали пищеварительную железу. Затем ее гомогенизировали в 0.02 М Трис-НСl буфере pH 8.5 с присутствием 1 мМ PMSF (ингибиование протеаз) и 10 мМ ДТТ (для предотвращения окисления сульфидрильных групп цистеиновых остатков аминокислот белков). Полученный гомогенат центрифугировали 50 мин при 10000 об./мин. Полученный супернатант (цитозоль) затем обрабатывали (10 мин, 75 °C) для получения фракции термостабильных белков. Фракцию, содержащую термостабильные белки, также центрифугировали 50 мин при 10000 об./мин, полученный супернатант осаждали 50 % ацетоном при 4 °C в течение 30 мин при постоянном перемешивании, затем осадок перерастворяли и доводили концентрацию ацетона до 80 %. Осаждение 80 % ацетоном проводили при -20 °C в течение 12 часов. Фракцию, содержащую 80 % ацетон, затем центрифугировали (10 мин при 10000 об./мин), полученный осадок ресуспенсировали в 0.02 М Трис-НСl буфере pH 8.5 (фракция D).

Аликвоту ресуспенсированного осадка (фракция D), содержащего термостабильные, устойчивые к ацетону белки, наносили на колонку Superosa 12 в системе FPLC при постоянном давлении и с постоянным током 0.02 М Трис-НСl буфера pH 8.5. Регистрацию выхода фракций проводили при λ 280 нм (Shimadzu UV-1800).

Элюированные фракции после FPLC, содержащие МТ-подобные белки, для иден-

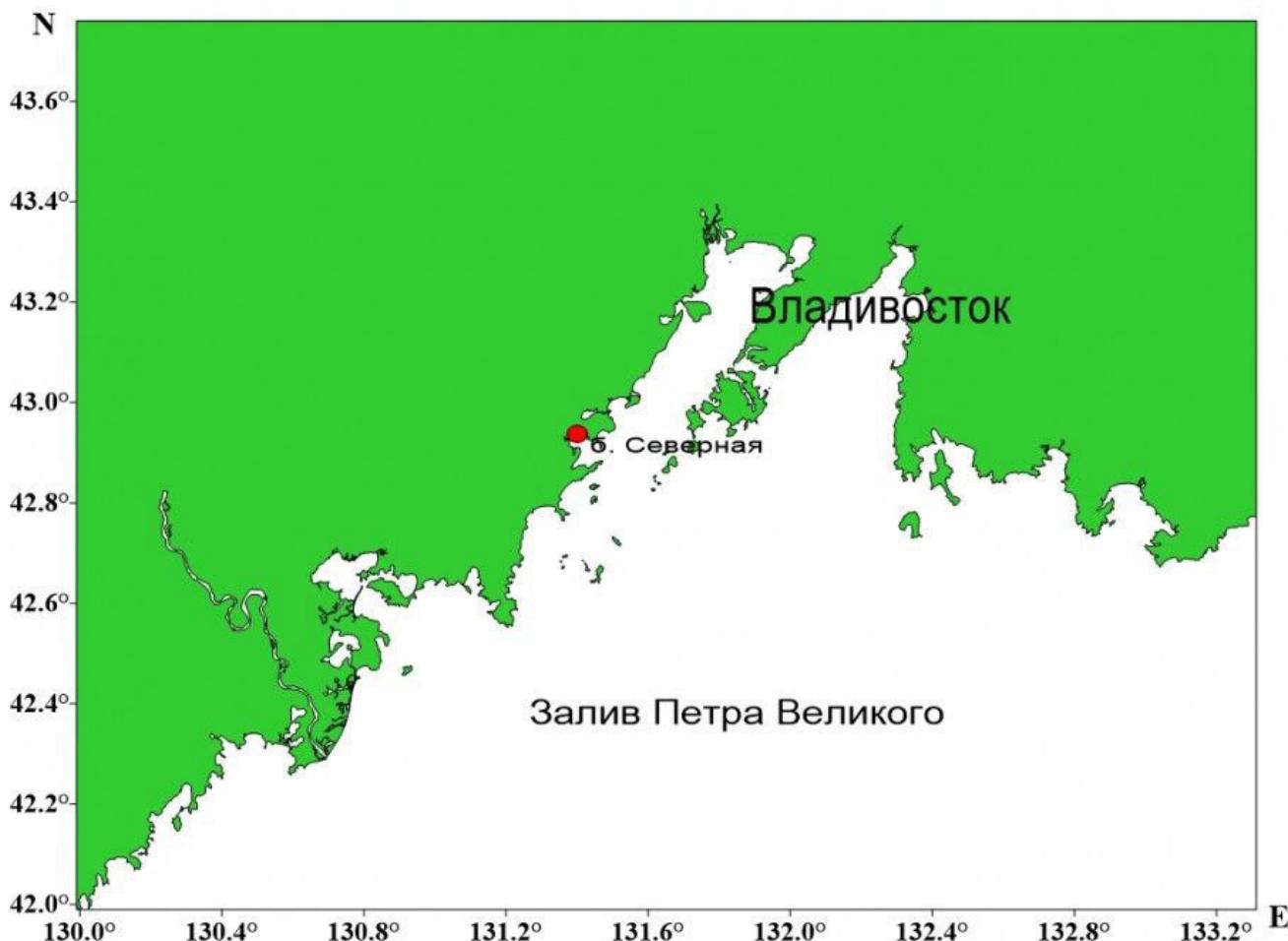


Рис. 1. Карта места отбора разновозрастных особей приморского гребешка *M. yessoensis* (бухта Северная залива Петра Великого Японского моря, 42° 93' N, 131° 40' E)

Fig. 1. The map of sampling stations located in the Sea of Japan (Severnaya Bay of the Peter the Great Bay 42° 93' N, 131° 40' E)

тификации молекулярного веса разделяли методом SDS-электрофореза в 9 % полиакриламидном геле по методу Лэмли (Laemmli, 1970). Окрашивание образцов проводили красителем Coomassie blue. В качестве маркеров стандартного молекулярного веса использовали смесь белков (PageRuler Prestained Protein Ladder), Fermentas (#SM0671 Lot: 00019482).

Содержание металлов (Cd, Zn, Cu) в ткани пищеварительной железы и содержание кадмия на каждом этапе фракционирования и в хроматографических фракциях измеряли атомно-абсорбционным спектрофотометром с пламенной атомизацией и коррекцией дейтериевого фона (Шимадзу AA-6800).

Содержание белка на каждой стадии субклеточного фракционирования и в хроматографических фракциях определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951).

Оценку интегральной антирадикальной активности белковых фракций проводили на основе способности фракций подавлять

реакцию окисления ABTS пероксильными и алкоксильными радикалами, образующимися при термическом разложении АВАР (2, 2'-азобис (2-аминопропан) гидрохлорид) (Bartosz et al., 1998). Состав реакционной смеси: 0.1 М фосфатный буфер pH 7.0, 50 мМ ABTS, 200 мМ АВАР. Измерения проводили при длине волны 414 нм. Величину активности рассчитывали с помощью калибровочного графика, построенного по «Тролоксу» (водорастворимый аналог витамина Е).

Статистически значимые различия между контролем и экспериментом были определены с использованием однокомпонентного анализа ANOVA. Все выводы сделаны на основании не менее 5 % уровня значимости

Результаты

В особях приморского гребешка *M. yessoensis* разного возраста (одно-, двух- и трехлетних) в ткани пищеварительной железы исследовали содержание таких металлов, как Cd, Zn и Cu (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация Cd, Zn и Cu мкг/г сух. веса в пищеварительной железе одно-, двух- и трехлетних особей *M. yessoensis*

Table 1. Concentrations of Cd, Zn and Cu in the digestive gland of 1-, 2- and 3-year-old scallops *M. yessoensis*

Возраст	1			2			3		
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
Контроль	65 ± 2.1	155 ± 5.7	13 ± 5.2	56 ± 2.8	132 ± 6.5	11 ± 0.5	107 ± 5.35	118 ± 4.7	12 ± 0.5
Опыт	733 ± 36	165 ± 6.4	17 ± 8.5	283 ± 13.5	95 ± 4.75	13 ± 0.45	321 ± 15.5	113 ± 5	17 ± 0.8

Пищеварительная железа исследуемых возрастных групп особей *M. yessoensis* содержит все три исследуемых металла: кадмий, цинк и медь. Содержание цинка в пищеварительной железе трех исследуемых групп контрольных животных выше, чем кадмия. Меди – наименьшее количество. Соотношение Cd:Zn:Cu в пищеварительной железе контрольных 1+ особей *M. yessoensis* составило 5:12:1, у 2+ особей – 5:12:1, у 3+ особей – 9:10:1. Таким образом, в контрольной группе одно- и двухлетних гребешков наблюдалась одинаковая способность к накоплению Cd, Zn и Cu.

Однако концентрации аккумулированного кадмия, цинка и меди у контрольных гребешков достоверно выше у однолетних особей по сравнению с двухлетками. У трехлетних контрольных особей концентрация аккумулированного кадмия выше в два раза, однако цинк аккумулируется в меньшей степени по сравнению с одно- и двухлетками. Количество меди остается на том же уровне.

После инкубации особей приморского гребешка кадмием (300 мкг/л CdCl₂) соотно-

шение Cd:Zn:Cu в пищеварительной железе трех исследуемых возрастных групп изменилось. У однолетних особей соотношение Cd:Zn:Cu составило 43:10:1, у двухлетних – 22:7:1, у трехлетних – 19:6,5:1. Таким образом, наибольшее сродство к кадмию наблюдается у однолетних особей приморского гребешка в условиях высокого содержания кадмия в окружающей среде, т. к. именно в данной группе наблюдается самая высокая степень аккумуляции токсичного металла. С увеличением возраста происходит уменьшение степени накопления данного металла в пищеварительной железе в два раза, с 733 до 321 мкг/г сух. веса.

1 год

Субклеточное разделение кадмия в пищеварительной железе годовалых особей приморского гребешка *M. yessoensis* показало, что большая его часть содержится в цитоплазматической фракции клетки, как у контрольных, так и экспериментальных животных. На долю фракции, содержащей МТ-подобные белки, приходится 25 % цитоплазматического кадмия в контроле и более 33 % в эксперименте.

Таблица 2. Субклеточное распределение кадмия (мкг/мг белка) в пищеварительной железе однолетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* в контрольных и экспериментальных (300 мкг Cd/л) условиях

Table 2. Cd content in subcellular fractions of the digestive gland of 1-year-old scallops *M. yessoensis* in control and experimental conditions (300 µg Cd/l)

Название пробы	Контроль		Эксперимент	
Гомогенат	2.8 ± 0.1	100 %	70 ± 3.5	100 %
Цитозоль	1.9 ± 0.09	68 %	43.5 ± 2	62 %
80 % осадок	0.48 ± 0.02	25 %	14.5 ± 0.7	33 %

В результате разделения фракции D методом гель-хроматографии были получены два кадмий-содержащих пика, соответствующих белкам с высоким молекулярным весом.

С помощью SDS-электрофореза обнаружено три пятна, соответствующих области 120 кДа, 72 кДа и 43 кДа (рис. 2).

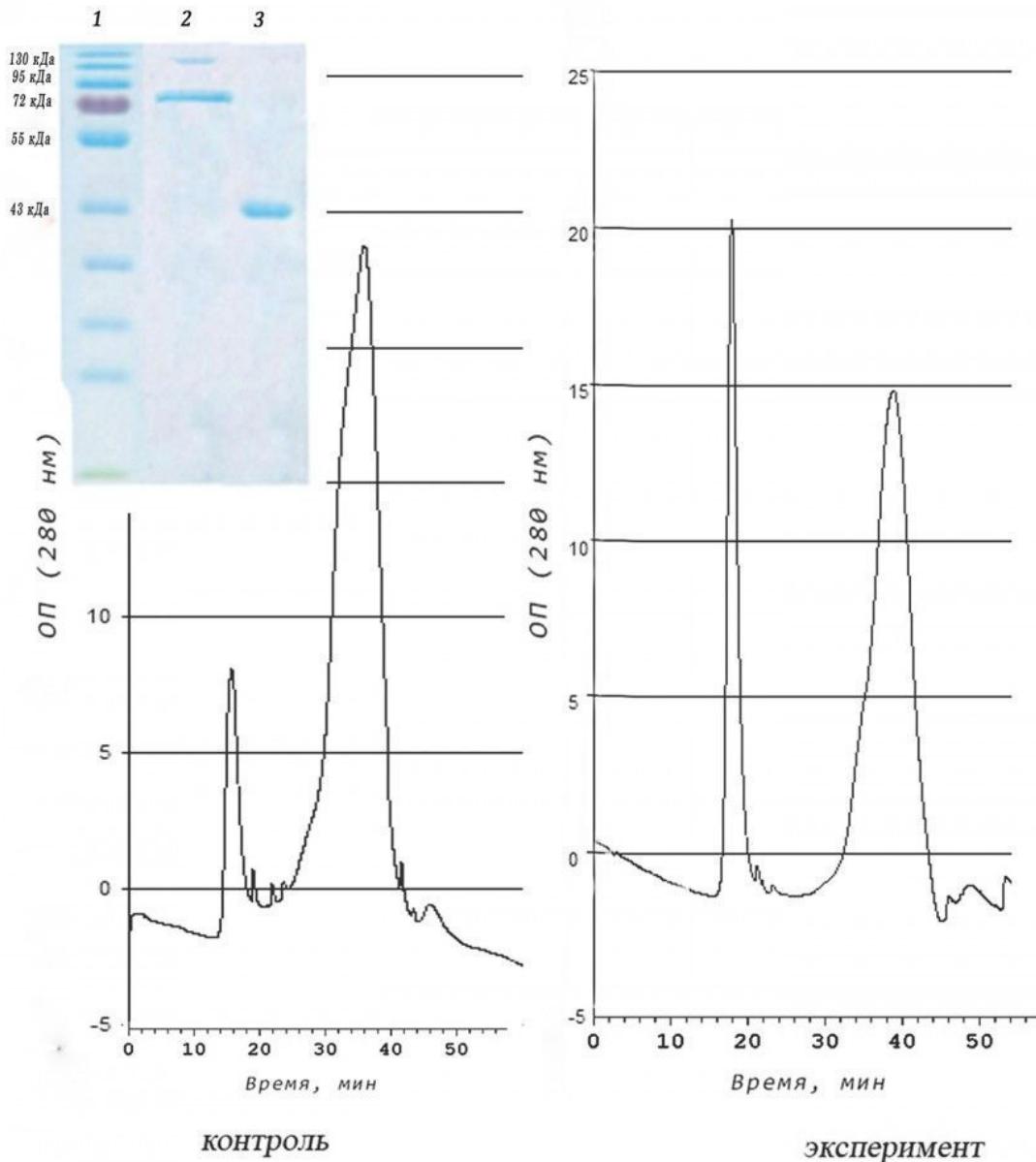


Рис. 2. Хроматографический профиль (FPLC, Superosa 12, λ 280 нм) ресуспендиированного ацетонного осадка пищеварительной железы однолетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* (контроль и эксперимент – CdCl_2 300 мкг/л) и SDS-электрофорез (9 %) элюированных пиков (1 и 2) контроля, окрашивание Coomassie blue

Fig. 2. Chromatographic profile (FPLC, Superosa 12, λ 280 nm) of the resuspended acetone residue (fraction D) of the digestive gland of 1-years-old scallops *M. yessoensis* (control and experiment – CdCl_2 , 300 $\mu\text{g/l}$) and SDS-electrophoresis (9 %) of the eluted peaks (1 and 2). Coomassie blue stained

Найдено, что все три идентифицированных белка связывают токсичный кадмий как в контрольной, так и экспериментальной группах исследуемых моллюсков (рис. 3).

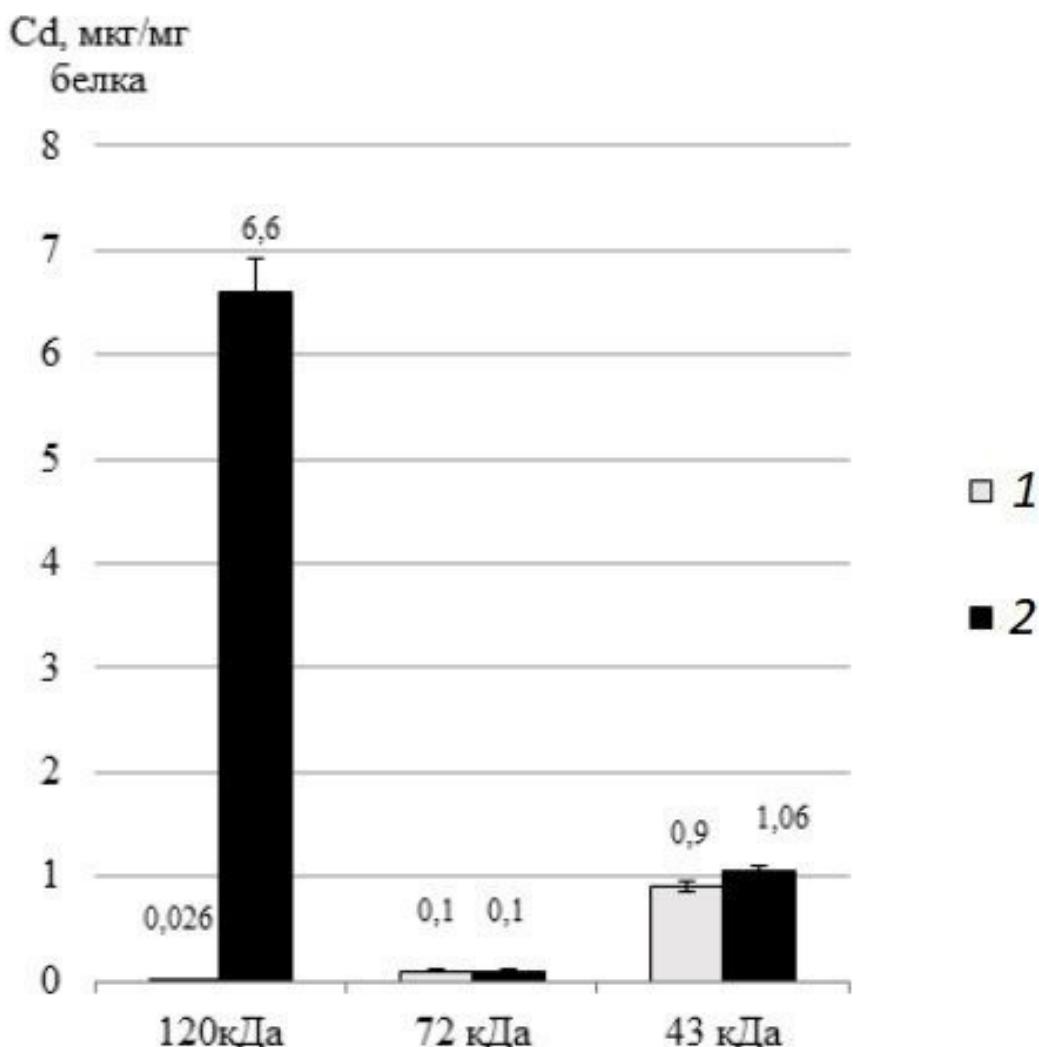


Рис. 3. Распределение кадмия (мкг/мг белка) среди МТ-подобных белков пищеварительной железы однолетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* контрольной (1) и экспериментальной (2) групп – CdCl_2 300 мкг/л

Fig. 3. The distribution of cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein) among the MT-like proteins of the digestive gland of one-year-old scallops *M. yessoensis* in control (1) and experimental (2) groups (CdCl_2 300 $\mu\text{g}/\text{l}$)

Получено, что в естественных условиях у годовалых особей *M. yessoensis* кадмий связывается главным образом с белком 43 кДа. Однако у особей, подвергнутых обработке кадмием, происходит перераспределение кадмия с белка 43 кДа на белок 120 кДа. Интересно, что белок с молекулярным весом 72 кДа не менял своего сродства к кадмию вне зависимости от условий эксперимента.

Изучение антиоксидантных свойств показало значительное различие в значениях

как между кадмий-связывающими белками в контрольных моллюсках, так и в экспериментальной группе гребешков. Результаты показали (рис. 4), что в естественной среде обитания кадмий-связывающие белки связывают аккумулированный кадмий и имеют следующие значения АО: для белка 120 кДа – 86 мМоль Тролокса/мг белка, для белка 72 кДа – 114 мМоль Тролокса/мг белка и для белка 43 кДа – 59 мМоль Тролокса/мг белка.

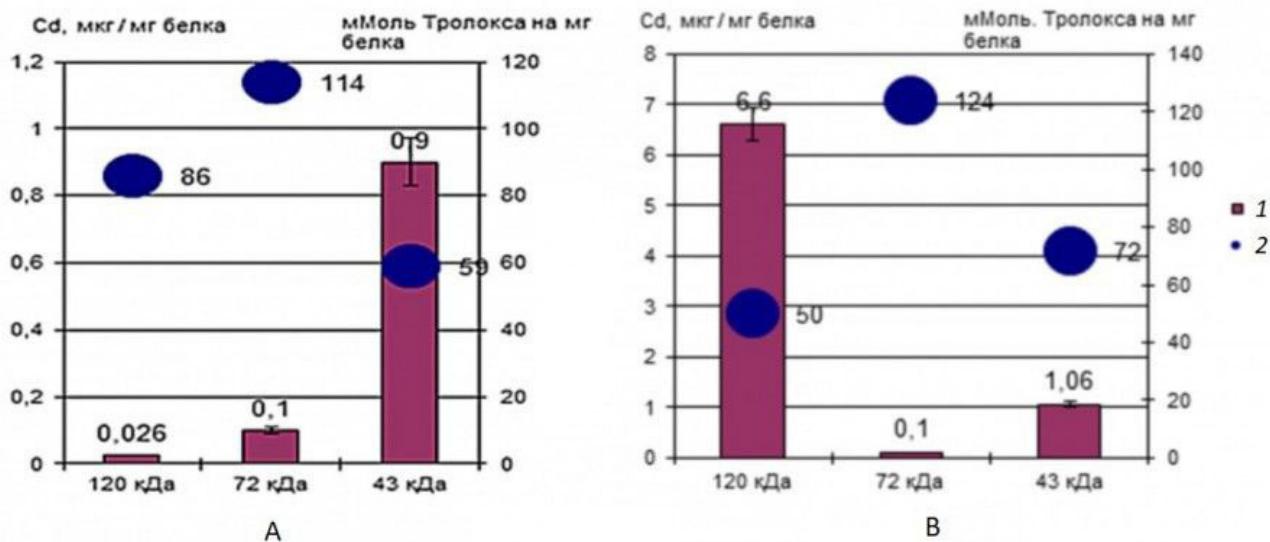


Рис. 4. АО активность (мМоль Тролокса/мг белка) среди МТ-подобных белков пищеварительной железы однолетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* контрольной (А) и экспериментальной групп (CdCl₂ 300 мкг/л) (1 - Cd, 2 - АО активность)

Fig. 4. AO activity (mMol Trolox/mg protein) of MT-like proteins of the digestive gland of one-year-old scallops *M. yessoensis* in control (A) and experimental (B) groups (1 - Cd, 2 - AO activity)

В экспериментальных условиях при накоплении кадмия в белках значения антиоксидантной (АО) активности для этих же белков изменились (см. рис. 4): для белка 120 кДа активность упала до 50 мМоль Тролокса/мг белка, для белка 72 кДа увеличилась до 124 мМоль Тролокса/мг белка, для белка 43 кДа увеличилась до 72 мМоль Тролокса/мг белка.

Результаты показали, что с увеличением связанного кадмия в белке АО активность белка снижается, и наоборот, с уменьшением связанного кадмия – увеличивается. Таким образом, в годовалых особях приморского гребешка белок 120 кДа выполняет

кадмий-связывающую функцию, а белок 72 кДа – антиоксидантную, в то время как белок 48 кДа отвечает за связывание кадмия в среде без нагрузки кадмием.

2 года

Субклеточное разделение кадмия в пищеварительной железе двухгодовалых особей приморского гребешка *M. yessoensis* показало, что большая часть кадмия содержится в мембранный фракции у контрольных особей (10 % цитоплазматического кадмия) и у экспериментальных животных (20 %). На долю фракции, содержащей МТ-подобные белки, приходится 20 и 25 % в контроле и эксперименте соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Субклеточное распределение кадмия (мкг/мг белка) в пищеварительной железе двухлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* в контрольных и экспериментальных (300 мкг Cd/л) условиях

Table 3. Cd content in subcellular fractions of the digestive gland of 2-year-old scallops *M. yessoensis* in control and experimental conditions (300 µg Cd/l)

Название пробы	Контроль	Эксперимент
Гомогенат	10 ± 0.3	100 %
Цитозоль	1 ± 0.03	10 %
80 % осадок	0.2 ± 0.01	20 %
		40 ± 2
		20 %
		8 ± 0.4
		25 %

Отличительной особенностью данной возрастной группы является резкое уменьшение количества высокомолекулярного

белка 120 кДа, который выполняет функцию связывания кадмия у годовиков (рис. 5).

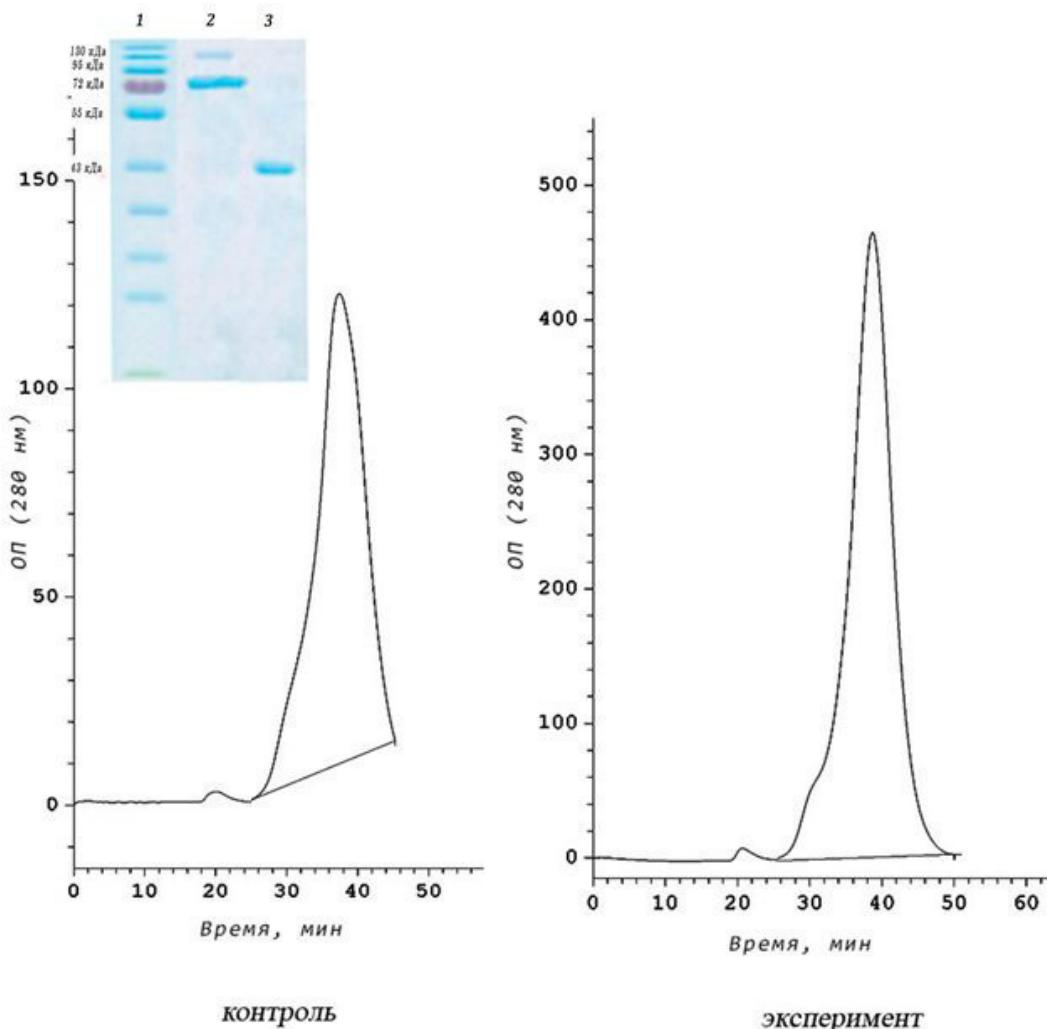


Рис. 5. Хроматографический профиль (FPLC, Superosa 12, λ 280 нм) ресуспендированного ацетонного осадка пищеварительной железы двухлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* (контроль и эксперимент – CdCl_2 300 мкг/л)

Fig. 5. Chromatographic profile (FPLC, Superosa 12, λ 280 nm) of the resuspended acetone residue (fraction D) of the digestive gland of 2-year-old scallops *M. yessoensis* (control and experiment – CdCl_2 300 $\mu\text{g/l}$) and SDS-electrophoresis (9 %) of the eluted peaks (1 and 2). Coomassie blue

Кроме того, данный белок не связывает кадмий вообще. Основным кадмий-связывающим белком двухгодовалых особей приморского гребешка является белок 72 кДа (рис. 6). При этом данный белок отвечает за связывание кадмия как у контрольных, так и экспериментальных особей *M. yessoensis*. В контроле белок связыва-

ет 0.18 мкг Cd/мг белка, а в экспериментальных условиях в 9 раз больше (1.6 мкг Cd/мг белка). Второй идентифицированный белок с молекулярной массой 43 кДа связывает незначительное количество кадмия и только в экспериментальных условиях (0.1 мкг Cd/мг белка).

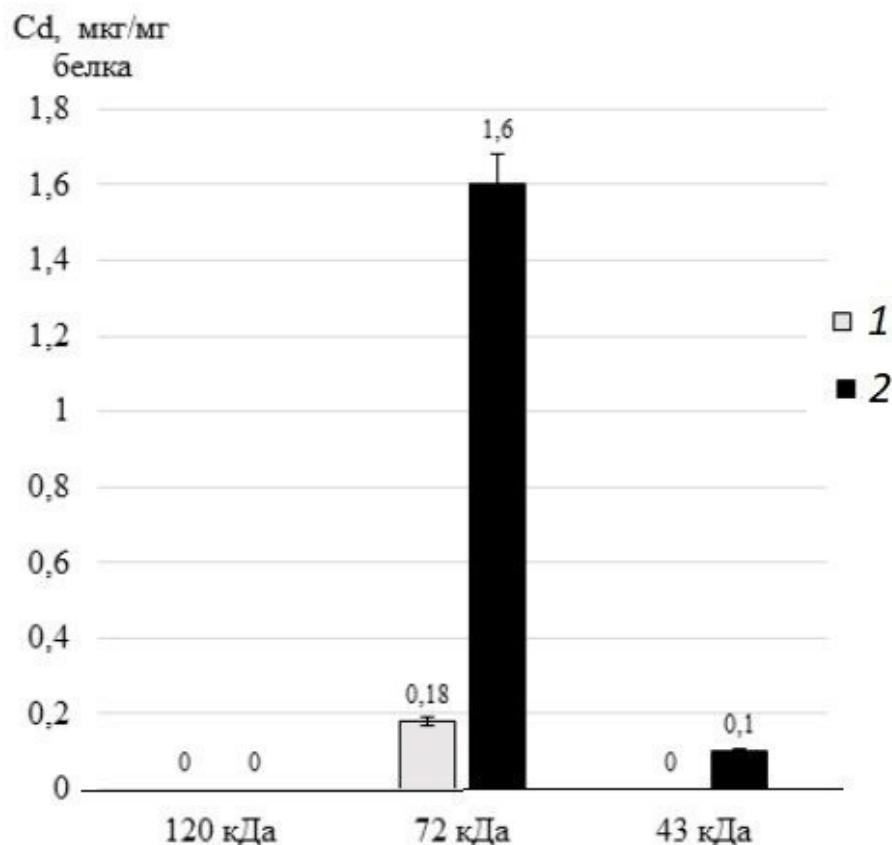


Рис. 6. Распределение кадмия (мкг/мг белка) среди МТ-подобных белков пищеварительной железы двухлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* контрольной (1) и экспериментальной (2) ($CdCl_2$ 300 мкг/л) групп

Fig. 6. The distribution of cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein) among the MT-like proteins of the digestive gland of two-year-old scallops *M. yessoensis* in control (1) and experimental (2) groups ($CdCl_2$ 300 $\mu\text{g}/\text{l}$)

Оценка антиоксидантной активности идентифицированных кадмий-связывающих белков у двухлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* показала значительное различие в значениях между кадмий-связывающими белками в контрольной и экспериментальной группах гребешков. Результаты показали (рис. 7), что в естественной среде обитания кадмий-связывающий белок 120 кДа имеет очень низкую АО активность – 0.086 мМоль Тролокса/мг белка, а при инкубации с кадмием активность рез-

ко возрастает до 59.33 мМоль Тролокса/мг белка. Основной кадмий-связывающий белок 72 кДа не меняет АО активность. При инкубации особей с кадмием активность данного белка пищеварительной железы лишь незначительно снижается с 47 до 42 мМоль Тролокса/мг белка. И более значительное снижение АО активности можно наблюдать у белка 43 кДа: снижение со 114 мМоль Тролокса/мг белка у контрольных моллюсков до 53 мМоль Тролокса/мг белка у экспериментальных гребешков.

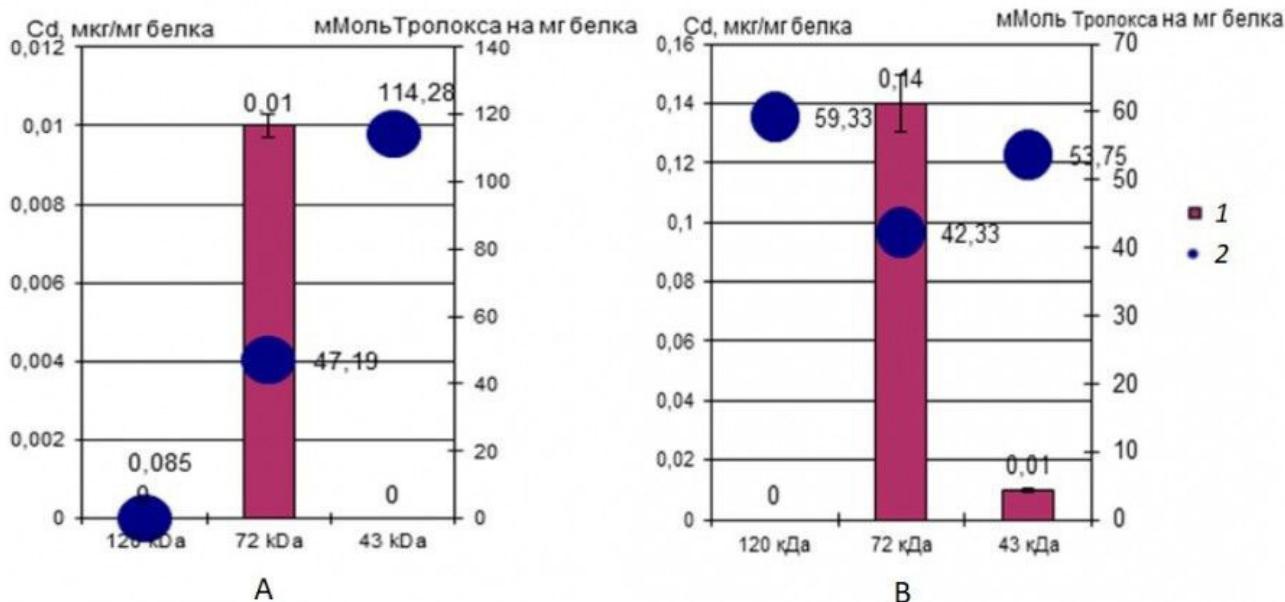


Рис. 7. АО активность (мМоль Тролокса/мг белка) среди МТ-подобных белков пищеварительной железы двухлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* контрольной (А) и экспериментальной групп (CdCl₂, 300 мкг/л) (В)

Fig. 7. AO activity (mM Trolox/mg protein) of MT-like proteins of the digestive gland of two-year-old scallops *M. yessoensis* in control (A) and experimental (B) groups

3 года

Субклеточное разделение кадмия в пищеварительной железе трехлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* показало, что половина (50 %) кадмия содержится в цитоплазматической фракции у контроль-

ных особей, 40 % аккумулированного кадмия – у экспериментальных животных. На долю фракции, содержащей МТ-подобные белки, приходится 30 и 37 % цитоплазматического кадмия для контроля и эксперимента соответственно.

Таблица 4. Субклеточное распределение кадмия (мкг/мг белка) в пищеварительной железе трехлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* в контрольных и экспериментальных (300 мкг Cd/l) условиях

Table 4. Cd content in subcellular fractions of the digestive gland 3-year-old scallops *M. yessoensis* in control and experimental conditions (300 µg Cd/l)

Название пробы	Контроль		Эксперимент	
Гомогенат	20 ± 1	100 %	50 ± 2.5	100 %
Цитозоль	10 ± 0.4	50 %	20 ± 1	40 %
80 % осадок	3 ± 0.12	30 %	7.5 ± 0.3	37 %

Отличительной особенностью данного исследуемого возраста является полное исчезновение белка 120 кДа из фракции полученных МТ-подобных белков (рис. 8). Основная роль в связывании кадмия переходит на белок 72 кДа, как у двухлетней группы при-

морского гребешка. Однако белок 43 кДа связывает кадмий (0.5 мкг Cd/мг белка) в контрольной группе гребешков в отличии от двухлеток, у которых данный белок не участвует в связывании данного металла.

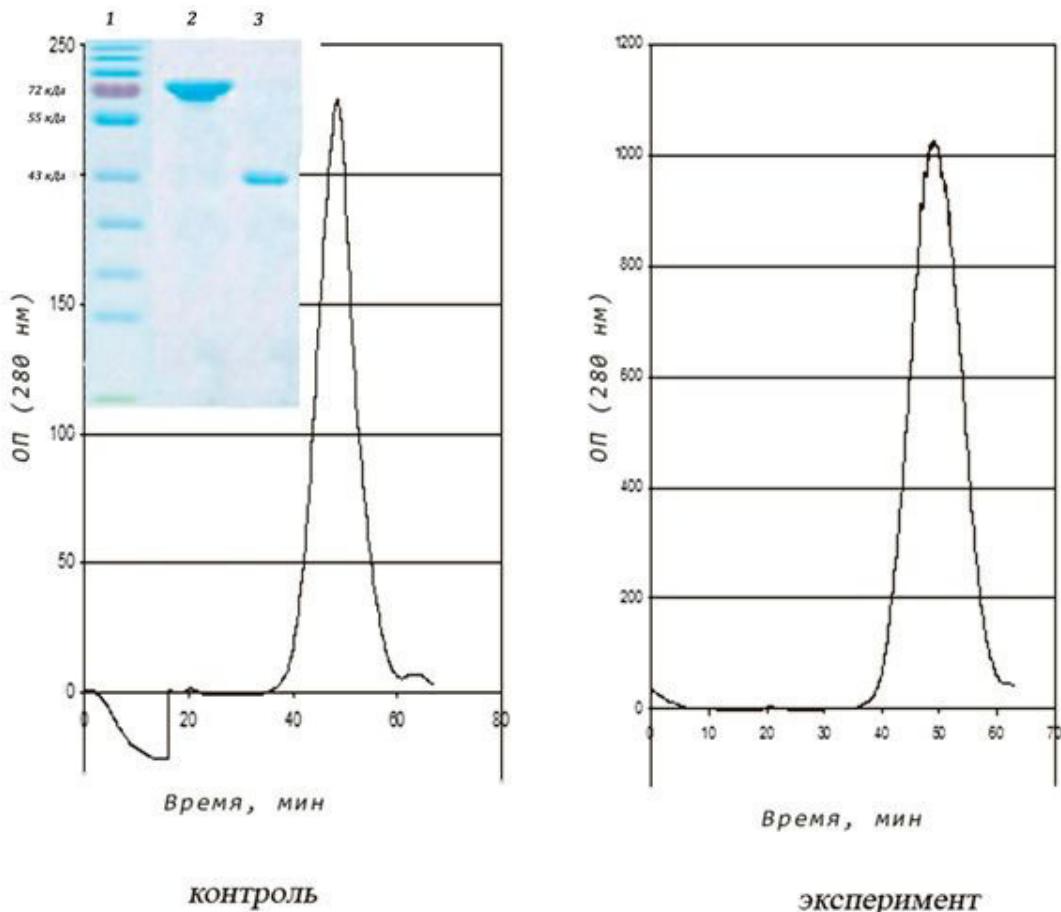


Рис. 8. Хроматографический профиль (FPLC, Superosa 12, λ 280 нм) ресуспендированного ацетонного осадка пищеварительной железы трехлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* (контроль и эксперимент – CdCl_2 300 мкг/л)

Fig. 8. Chromatographic profile (FPLC, Superosa 12, λ 280 nm) of the resuspended acetone residue (fraction D) of the digestive gland of 1-year-old scallops *M. yessoensis* (control and experiment – CdCl_2 300 $\mu\text{g/l}$) and SDS-electrophoresis (9 %) of the eluted peaks (1 and 2). Coomassie blue stained

Особенностью данного возраста является также количество связанного кадмия с белком 72 кДа. В контрольных особях *M. yessoensis* данный белок связывает 2.08 мкг Cd/мг белка, что выше в 20 раз по сравнению с годовичками и в 11.5 раза по сравнению с двухлетками (рис. 9).

Антиоксидантная активность идентифицированных кадмий-связывающих белков у трехлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* значительно отличается от кадмий-связывающих белков однолетних особей и незначительно отличается от двухгодовалых особей приморского гребешка. Так, значение АО активности белка 72 кДа ниже у трехлеток в 1.7 раза как в группе контрольных моллюсков, так и в экспериментальной группе по сравнению с однолетками. По сравнению с двухлетками значения

АО активности белка 72 кДа выросло с 42 до 65.33 мМоль Тролокса/мг белка для контроля и с 42 до 72 мМоль Тролокса/мг белка для эксперимента.

Результаты также показали (рис. 10), что в естественной среде обитания кадмий-связывающий белок 43 кДа имеет АО активность – 110.28 мМоль Тролокса/мг белка, которая при инкубации гребешков с кадмием резко возрастает до 153.75 мМоль Тролокса/мг белка, что является наиболее высоким показателем АО активности среди кадмий-связывающих белков всех трех исследуемых групп. Видно, что основной кадмий-связывающий белок 72 кДа не меняет АО активности. Белок 43 кДа у трехлетних особей имеет в основном АО функцию при повышении кадмия в среде.

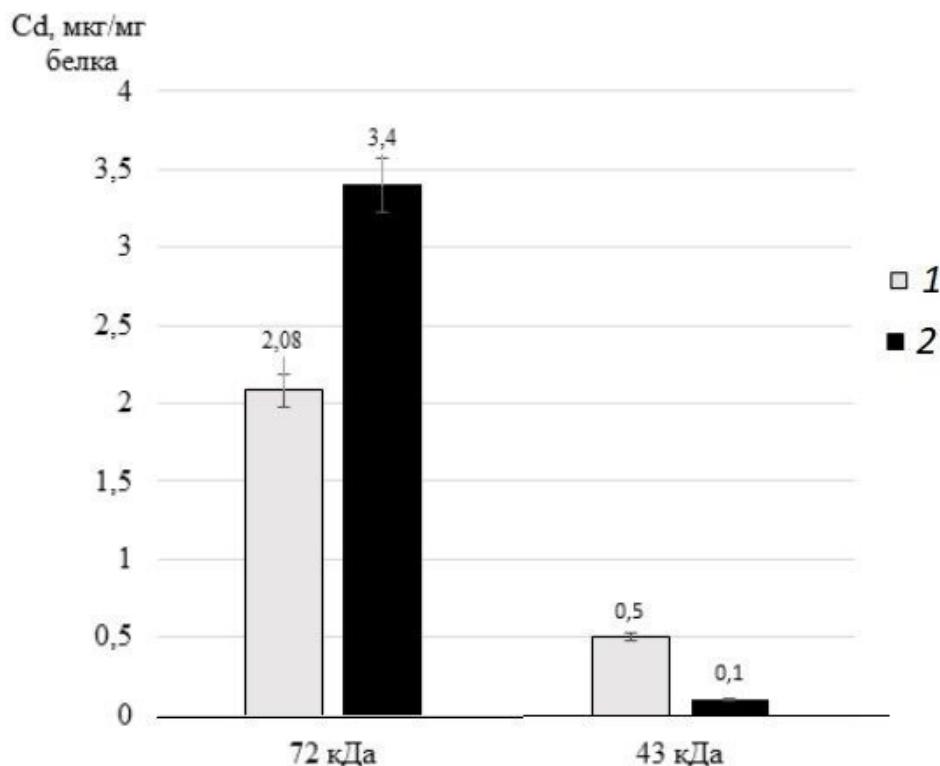


Рис. 9. Распределение кадмия (мкг/мг белка) среди МТ-подобных белков пищеварительной железы трехлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* контрольной и экспериментальной групп – CdCl_2 300 мкг/л

Fig. 9. The distribution of cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein) among the MT-like proteins of the digestive gland of three-year-old scallops *M. yessoensis* in control and experimental groups (CdCl_2 300 $\mu\text{g}/\text{l}$)

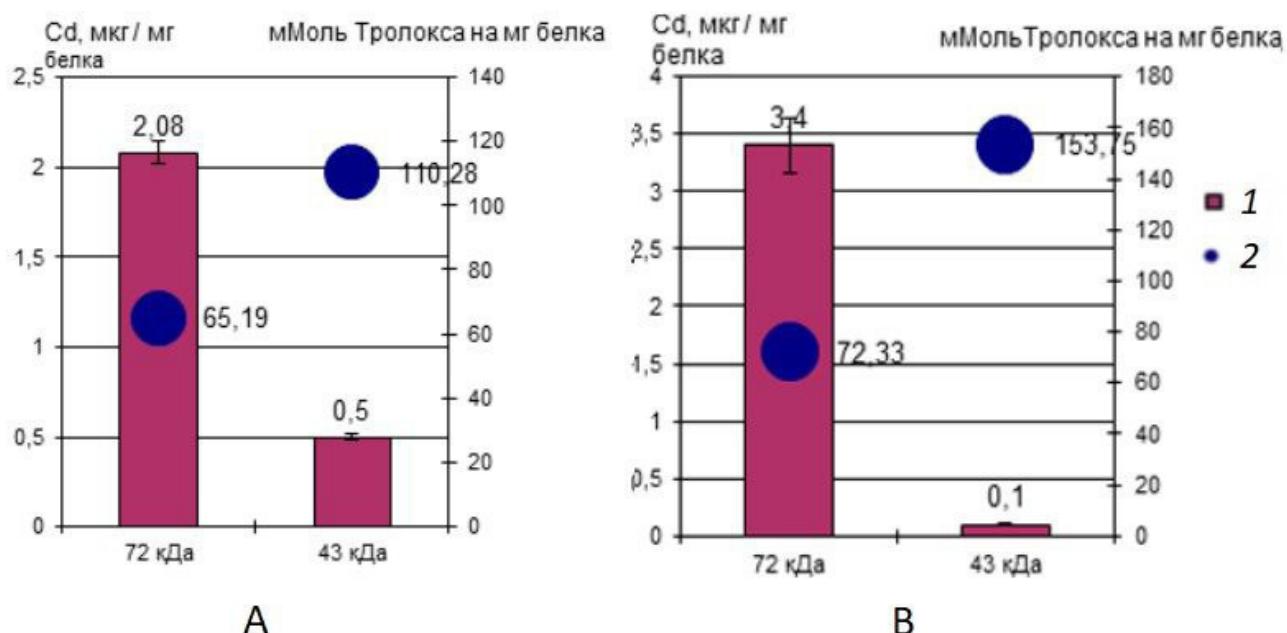


Рис. 10. АО активность (мМоль Тролокса/мг белка) среди МТ-подобных белков пищеварительной железы трехлетних особей приморского гребешка *M. yessoensis* контрольной (А) и экспериментальной групп (CdCl_2 300 мкг/л) (В)

Fig. 10. AO activity (mM Trolox/mg protein) of MT-like proteins of the digestive gland of three-year-old scallops *M. yessoensis* in control (A) and experimental (B) groups

Обсуждение

В ходе проведенного эксперимента получено, что наибольшее количество цитоплазматического кадмия наблюдается в возрастной группе 1 год, меньшее количество у трехлетних, затем идут двухлетние особи *M. yessoensis*. Данный результат характерен как для контрольных моллюсков, так и для экспериментальных. Таким образом, результаты более ранних исследований (Бельчева, 2002) по накоплению кадмия в мягких тканях приморского гребешка необходимо дополнить. Так как авторы не проводили исследования на годовалых особях и нет данных по накоплению у двухлеток, то мы можем сказать, что в возрастной группе 1–3 года концентрация кадмия в пищеварительной железе не зависит от размера раковины, по крайней мере для садковых гребешков. Так, в ходе эксперимента получено, что гребешки 2-го года накапливают кадмий в меньшем количестве. Мы предполагаем, что данный факт связан с тем, что в садковых условиях марикультурного хозяйства приморский гребешок достигает половой зрелости в два года, поэтому в данной возрастной группе происходит перестройка метаболических путей и данный возраст не является показательным при изучении аккумуляции кадмия. Данный факт подтверждается как при тканевом накоплении металлов (Cd, Zn и Cu), где меньше всего аккумулированы металлы, так и в изучении распределения кадмия на стадии субклеточного фракционирования, где на долю цитоплазматического кадмия приходится только 10 % в контроле и 20 % в эксперименте. В работах по изучению накопления металлов в пищеварительной железе *M. yessoensis* (Силина, 2004) не найдено кадмия у двухлетних особей гребешка, отобранного в июне из района Амурский залив (сильное антропогенное загрязнение), а у трехлеток кадмий достигал 142 мкг/ г сух. ткани.

Распределение и уровень накопления физиологически важных металлов в пищеварительной железе приморского гребешка зависят от сезона и возраста (Бельчева, 2002). Наибольшее накопление металлов цинка в пищеварительной железе наблюдается в марте с увеличением массы пищеварительной железы, а меди – в июне. Однако авторы не рассматривали возраст гребешка меньше 3 лет. Накопление кадмия не зависит от сезона и коррелирует с высотой раковины. Подобное утверждение можно считать

верным при соблюдении условия фоновых концентраций кадмия в среде. В нашем эксперименте, проведенном в июне, видно, что с увеличением высоты раковины и, как следствие, возраста происходит уменьшение количества аккумулированного кадмия.

Исследование возрастных особенностей накопления таких металлов, как кадмий, цинк и медь, в приморском гребешке проводились ранее (Lukyanova et al., 1993). Обще-принятым считается, что с увеличением массы мягких тканей происходит и накопление металлов в большем количестве у разных представителей семейства Pectinidae (Greig et al., 1978; Mauri et al., 1990; Uthe, Chou, 1987). Однако наше исследование утверждает, что в условиях высокого содержания кадмия в среде степень аккумуляции этого металла в возрастной группе 1–3 года не зависит от размера раковины. Тем не менее аккумуляция кадмия в пищеварительной железе зависит от возраста. На других видах семейства Pectinidae возрастом в 1 год подобных исследований не найдено. Мы отметили, что годовички приморского гребешка аккумулируют больше кадмия в условиях нагрузки тяжелым металлом благодаря наличию в ткани пищеварительной железы высокомолекулярного кадмий-связывающего МТ-подобного белка. Также получено, что начиная с трехлетнего возраста происходит стабилизация метаболических процессов и основная роль в связывании кадмия принадлежит белку с молекулярным весом 72 кДа. Однако в исследованиях на 5–7-летних особях было установлено, что в контрольных условиях основным кадмий-связывающим белком является белок 48 кДа, а в условиях нагрузки кадмием – 72 кДа (Zhukovskaya et al., 2012).

В нашем исследовании также была выявлена и оценена способность Cd-связывающих МТ-подобных белков проявлять свойства антиоксиданта в приморском гребешке в ответ на поступление в организм кадмия. Известно, что в ответ на действие прооксидантов организм реагирует каскадом реакций антиоксидантной системы – антиоксидантным ответом. Одним из вариантов антиоксидантной защиты организма в ответ на стресс различной природы в организме морских беспозвоночных повышается уровень МТ (Viarengo et al., 1988; Zapata-Vivenes et al., 2007). Поэтому эти белки нередко используются исследователями в качестве биомаркеров специфического стресса. В нашей работе исследование общей антирадикаль-

ной активности МТ-подобных белков пищеварительной железы приморского гребешка *M. yessoensis* показало, что исследуемые белки способны поглощать кислородные радикалы, а следовательно, являются одним из механизмов антиоксидантной защиты у приморского гребешка. Снижение уровня TOSC у исследуемых металл-связывающих белков у неполовозрелого гребешка можно рассматривать как механизм адаптации к условиям изменяющейся окружающей среды. Данные результаты соотносятся с результатами на других представителях двустворчатых моллюсков. Например, подобные исследования были выполнены на мидии *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo et al., 2000), где авторы показали, что аккумулированный кадмий связывается с МТ, которые при нетоксичной дозе кадмия обладают свойствами антиоксиданта.

Заключение

В результате проведенного эксперимента нам удалось обнаружить разновозрастные

особенности в накоплении кадмия у приморского гребешка *M. yessoensis*. Получено, что годовалые особи приморского гребешка способны связывать кадмий в большем количестве среди исследуемых возрастов (1, 2 и 3 года). Данная особенность согласуется с наличием в ткани пищеварительной железы белка с молекулярной массой 120 кДа. Обнаружено, что данный белок теряет функцию связывания кадмия у двухлетних особей и не синтезируется у трехлетних гребешков в пищеварительной железе вообще, ни в контроле, ни в ответ на высокие концентрации кадмия в среде. Двухлетние особи приморского гребешка не связывают кадмий в количестве, близком по значению с трехлетними и годовалыми особями гребешка, в связи с перестройкой биохимического аппарата и переходом моллюсков к половозрелой стадии. Трехлетние особи стабилизируют свой биохимический аппарат адаптации к кадмию, и их способность к связыванию кадмия сравнима с взрослыми, 5–7 летними, особями *M. yessoensis*.

Библиография

Бельчева Н. Н., Силина А. В., Слинько Е. Н., Челомин В. П. Сезонная изменчивость уровней Fe, Zn, Cu, Mn и Cd в гепатопанкреасе приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* // Биология моря. 2002. Т. 28. № 6. С. 442–448.

Силина А. В., Бельчева Н. Н. Возрастная и сезонная изменчивости концентраций физиологически важных металлов в пищеварительной железе приморского гребешка из загрязненных и чистых районов // Бюллетень Дальневосточного малакологического общества. 2004. Вып. 8. С. 56–67.

Bartosz J. A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity // Biochemistry and molecular biology international. 1998. Vol. 46. No 3. P. 519–528. DOI: 10.1080/15216549800204042.

Chelomin V. P., Belcheva N. N. Alterations of microsomal lipid synthesis in gill cells of bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation // Comp. Biochem. and Physiol. 1991. Vol. 99 C. № 1–2. P. 1–5.

Chelomin V. P., Bobkova E. A., Lukyanova O. N., Chekmasova N. M. Cadmium-induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis* // Comp. Biochem. and Physiol. 1995. Vol. 110 C. № 3. P. 329–335.

Fowler B. A., Gould E. Ultrastructural and biochemical studies of intracellular metal-binding patterns in kidney tubule cells of the scallop, *Placopecten magellanicus*, following prolonged exposure to cadmium or copper // Mar. Biol. 1988. Vol. 97. P. 207–216.

Greig R. A., Wenzloff D. R., MacKenzie C. L. Jr., Merrill A. S., Zdanowicz V. S. Trace metals in sea scallops, *Placopecten magellanicus*, from eastern United States // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1978. Vol. 19. P. 326–334.

Laemly K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. № 5259. P. 680–685.

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. P. 265–275.

Lukyanova O. N., Belcheva N. N., Chelomin V. P. Cadmium bioaccumulation in the scallop *Mizuhopecten yessoensis* from an unpolluted environment // Ecotoxicology of metals in invertebrates. Edited by R. Dalinger and F. Rainbow. Lewis Publisher, 1993. P. 25–35.

Mauri M., Orlando E., Nigro M., Regoli F. Heavy metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki* // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1990. Vol. 67. P. 27–33.

Ponzano E., Dondero E., Bouquegneau J.-M., Sack R., Hunziker P., Viarengo A. Purification and biochemical characterization of cadmium metallothionein from the digestive gland of the Antarctic scallop *Ad-*

amussium colbecki (Smith, 1902) // Polar Biology. 2001. Vol. 24. P. 147–153.

Roesijadi G., Fowler B. A. Purification of invertebrate metallothioneins // Methods in Enzymology. 1991. Vol. 205. P. 263–273.

Roesijadi G., Kielland S. L., Klerks P. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins // Archiv. Biochem. Biophys. 1989. Vol. 273. P. 403–413.

Stone H. C., Wilson S. B., Overnell J. Cd-binding proteins in the scallop *Pecten maximus* // Environ. Health Perspect. 1986. Vol. 65. P. 189–191.

Stone H. C., Wilson S. B., Overnell J. Cadmium binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization // Comp. Biochem. Physiol. 1986. Vol. 85 C. P. 259–268.

Thompson J. A. J., Sutherland A. E. A. Comparison of methods for sample clean-up prior to quantification of metal-binding proteins // Comp. Biochem. Physiol. 1992. Vol. 102. No 4 B. P. 769–772. DOI: 1016/0305-0491(92)90077-5.

Uthe J. F., Chou C. L. Cadmium in sea scallop (*Placopecten magellanicus*) tissues from clean and contaminated areas // Canad. J. Fish. Aquat. Sci. 1987. Vol. 44. P. 91–98.

Viarengo A., Burlando B., Certto N., Panfoli I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview // Cell. Mol. Biol. 2000. Vol. 304. № 46 (2). P. 407–117.

Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Biasi F., Cecchini G., Orunesu M. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues // Mar. Environ. Res. 1988. Vol. 24. P. 355–359.

Zapata-Vivenes E., Nusetti O. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis* // Journal of Shellfish research. 2007. Vol. 26. № 2. P. 335–344.

Zhukovskaya A. F., Belcheva N. N., Slobodskova V. V., Chelomin V. P. Metallothionein-like proteins induced by cadmium stress in the scallop *Mizuhopecten yessoensis* // Ocean Science Journal. 2012. Vol. 47. № 3. P. 189–195.

SOME AGE FEATURES OF BIOCHEMICAL ADAPTATION TO CADMIUM IN SCALLOP *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS*

ZHUKOVSKAYA
Avianna Fayazovna

POI FEB RAS, aviannaZh@gmail.com

SLINKO
Elena Nikolaevna

POI FEB RAS, aviannaZh@gmail.com

CHELOMIN
Viktor Pavlovich

POI FEB RAS, chelomin@poi.dvo.ru

Key words:
MT-like proteins
heavy metals
toxicity
bivalve mollusks
adaptation

Summary: The scallop *Mizuhopecten yessoensis* is a Far Eastern representative of bivalve mollusks capable of accumulating cadmium in soft tissues without any visible pathological effect even in those habitats where cadmium does not exceed background values. This unique feature is caused by two MT-like Cd-binding proteins with the molecular mass of 72 and 43 kDa. They present at least in the tissues of the digestive gland of adult *M. yessoensis* (aged 5-7 years), one of the main organs accumulating heavy metals. As for 1-, 2-, 3-year-old scallops *M. yessoensis*, their mechanisms of adaptation to cadmium are unknown. At that, it is the age groups that mainly used in mariculture farms. Therefore, the aim of this work was to clarify the features of adaptation to cadmium in these age groups of the *M. yessoensis*. The scallops *M. yessoensis* were obtained from Severnaya Bay of the Northern part of the Peter the Great Bay of the Sea of Japan (42°93'N, 131°40'E) and were transported to the laboratory of POI FEB RAS in Vladivostok. Then scallops were exposed to CdCl₂ (300 µg/ml). To identify MT-like proteins, standard techniques for the isolation of MT from marine invertebrates and other necessary biochemical methods were used. As a result of the experiment on the accumulation of cadmium (300 µg/ml CdCl₂), different age features of the accumulation of such metals as Cd, Zn and Cu by the digestive gland of *M. yessoensis* were found. It was stated that one-year-old scallops are able to bind cadmium to a greater amount than other investigated age groups. This feature is consistent with the presence of proteins with a molecular weight of 120 kDa in the digestive gland. Whereas in the two-years old scallops *M. yessoensis* this protein loses its binding function, and in 3-year old species its synthesis completely stops. On reaching maturity (3 years) the main cadmium-binding protein in the digestive gland of *M. yessoensis* becomes MT-like protein 72 kDa. Besides, it was found that in the two-year-old scallops a rearrangement of metabolism due to the transition to the mature stage occurred. We assume that due to this reason they do not bind cadmium in the amount close to 3-year old scallops. Total antioxidant capacity of Cd-binding proteins in 1-, 2- and 3-year-old scallops *M. yessoensis* was also studied. Thus, it was shown that the 1- and 3-years old individuals of *M. yessoensis* have a well-developed system of adaptation to cadmium. It is shown that these age groups are able to accumulate cadmium both in control conditions and when exposed to sea water with high cadmium content.

Reviewer: I. N. Bahmet

Received on: 04 March 2019

Published on: 19 June 2019

References

Bartosz J. A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity. Biochemistry and molecular biology international. 1998. Vol. 46. No 3. P. 519–528. DOI: 10.1080/15216549800204042.

Bel'cheva N. N. Silina A. V. Slin'ko E. N. Chelomin V. P. Seasonal variability of the levels of Fe, Zn, Cu, Mn and Cd in the hepatopancreas of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*, *Biologiya morya*. 2002. T. 28. No. 6. P. 442–448.

Chelomin V. P., Belcheva N. N. Alterations of microsomal lipid synthesis in gill cells of bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation, *Comp. Biochem. and Physiol.* 1991. Vol. 99 C. No. 1–2. P. 1–5.

Chelomin V. P., Bobkova E. A., Lukyanova O. N., Chekmasova N. M. Cadmium-induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis*, *Comp. Biochem. and Physiol.* 1995. Vol. 110 C. No. 3. P. 329–335.

Fowler B. A., Gould E. Ultrastructural and biochemical studies of intracellular metal-binding patterns in kidney tubule cells of the scallop, *Placopecten magellanicus*, following prolonged exposure to cadmium or copper, *Mar. Biol.* 1988. Vol. 97. P. 207–216.

Greig R. A., Wenzloff D. R., MacKenzie C. L. Jr., Merrill A. S., Zdanowicz V. S. Trace metals in sea scallops, *Placopecten magellanicus*, from eastern United States, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1978. Vol. 19. P. 326–334.

Laemly K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 1970. No. 5259. P. 680–685.

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. P. 265–275.

Lukyanova O. N., Belcheva N. N., Chelomin V. P. Cadmium bioaccumulation in the scallop *Mizuhopecten yessoensis* from an unpolluted environment, *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Edited by R. Dalinger and F. Rainbow. Lewis Publisher, 1993. P. 25–35.

Mauri M., Orlando E., Nigro M., Regoli F. Heavy metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1990. Vol. 67. P. 27–33.

Ponzano E., Dondero E., Bouquegneau J. M., Sack R., Hunziker P., Viarengo A. Purification and biochemical characterization of cadmium metallothionein from the digestive gland of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith, 1902), *Polar Biology*. 2001. Vol. 24. P. 147–153.

Roesijadi G., Fowler B. A. Purification of invertebrate metallothioneins, *Methods in Enzymology*. 1991. Vol. 205. P. 263–273.

Roesijadi G., Kielland S. L., Klerks P. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins, *Archiv. Biochem. Biophys.* 1989. Vol. 273. P. 403–413.

Silina A. V. Bel'cheva N. N. Age and seasonal variability of concentrations of physiologically important metals in the digestive gland of seaside scallop from polluted and clean areas, *Byulleten' Dal'nevostochnogo malakologicheskogo obschestva*. 2004. Vyp. 8. P. 56–67.

Stone H. C., Wilson S. B., Overnell J. Cd-binding proteins in the scallop *Pecten maximus*, *Environ. Health Perspect.* 1986. Vol. 65. P. 189–191.

Stone H. C., Wilson S. B., Overnell J. Cadmium binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization, *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. Vol. 85 C. P. 259–268.

Thompson J. A. J., Sutherland A. E. A. Comparison of methods for sample clean-up prior to quantification of metal-binding proteins, *Comp. Biochem. Physiol.* 1992. Vol. 102. No 4 B. P. 769–772. DOI: 10.1016/0305-0491(92)90077-5.

Uthe J. F., Chou C. L. Cadmium in sea scallop (*Placopecten magellanicus*) tissues from clean and contaminated areas, *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 1987. Vol. 44. P. 91–98.

Viarengo A., Burlando B., Certto N., Panfoli I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview, *Cell. Mol. Biol.* 2000. Vol. 304. No. 46 (2). P. 407–117.

Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Biasi F., Cecchini G., Orunesu M. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues, *Mar. Environ. Res.* 1988. Vol. 24. P. 355–359.

Zapata-Vivenes E., Nusetti O. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*, *Journal of Shellfish Research*. 2007. Vol. 26. No. 2. P. 335–344.

Zhukovskaya A. F., Belcheva N. N., Slobodskova V. V., Chelomin V. P. Metallothionein-like proteins induced by cadmium stress in the scallop *Mizuhopecten yessoensis*, *Ocean Science Journal*. 2012. Vol. 47. No. 3. P. 189–195.