

ВЛИЯНИЕ АНОКСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ И СОСТАВ КАРОТИНОИДОВ В ТКАНЯХ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© 2019 Бородина А.В.^{а, *}, Солдатов А.А.^{а, b, **}

^а ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь, 299011, Россия;

^б ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, Севастополь, 299053, Россия;

e-mail: *borodinaav@mail.ru, **alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.06.2019. После доработки 06.08.2019. Принята к публикации 19.08.2019

В условиях эксперимента исследовали влияние экспериментальной аноксии на содержание и качественный состав каротиноидов в тканях двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Содержание кислорода в воде понижали путём барботажа её азотом в течение 5 часов. Экспозиция – трое суток. Пробы тканей (жабры, нога, гепатопанкреас) отбирали перед опытом (контроль), а также на 1-е, 2-е и 3-и сутки эксперимента. Температура воды поддерживалась на уровне 16–17 °С. Показано, что в условиях аноксии каротиноиды перераспределяются в пользу респираторных поверхностей. В жабрах увеличивается доля розово-алых пигментов: пектенолона и его эфиров (пектенолоновый комплекс). Во всех исследованных органах в условиях аноксии существенно повышается относительное содержание эфиров пектенолона, а также отмечается незначительный рост уровня эфиров алло-, диато- и зеаксантинов.

Ключевые слова: аноксия, каротиноиды, *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), Чёрное море.

Введение

Появление *Anadara kagoshimensis* (далее анадара) в Чёрном море связывают с заносом личинок данного вида с балластными водами [Шиганова, 2009]. Прежнее название – *Anadara inaequalis* (Bruguere, 1789). Нативный ареал моллюска – Японское, Южно-Китайское и Жёлтое моря [Broom, 1985]. Впервые в Чёрном море данный вид был обнаружен у берегов Кавказа в 1968 г. [Киселёва, 1992]. Массовые поселения моллюска у западных и восточных берегов черноморского региона стали отмечаться в начале 1980-х гг. [Маринов, 1990; Киселёва, 1992; Иванов, Синегуб, 2008]. Считается, что на данный момент анадара полностью реализовала свой биотический потенциал в основном на западном и восточном участках шельфа Чёрного моря, превратившись в одну из руководящих форм бентоса [Ревков, 2015, 2016].

Сравнительный анализ показал, что анадара обладает более широким адаптационным потенциалом, чем остальные виды черноморских двустворок. Моллюск устойчив к экстремально низким концентрациям кислорода и может длительно переживать условия аноксии [Cortesi et al., 1992; Zwaan, Babarro, 2002]. При нормоксии он потребляет в 5–6 раз меньше кислорода, чем другой массовый черноморский вид *Mytilus galloprovincialis* [Soldatov et al., 2010]. Основу этой устойчивости определяют присутствие в гемолимфе моллюска эритроцитарного гемоглобина [Cortesi et al., 1992; Holden et al., 1994] и высокое содержание каротиноидов в тканевых структурах [Borodina, 2016].

Содержание каротиноидов в тканях анадары может составлять 3–5 мг 100 г⁻¹ сырого веса [Borodina, 2016]. При помощи методов масс-спектрометрии, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии

в тканях анадары было идентифицировано 6 видов каротиноидов: β -каротин, пектенолон, пектенол А, зеаксантин, диатоксантин, аллоксантин, а также эфиры пектенолона, алло-, диато- и зеаксантинов [Vorodina, 2016]. Более 90% приходилось на аллоксантин, пектенолон и эфиры алло- и диатоксантина. При этом около 46% от суммарного уровня каротиноидов было сосредоточено в ноге моллюска, что отличало этот вид моллюсков от мидий и устриц [Vorodina, 2016]. Отмечено, что каротиноиды играли существенную роль в поддержании антиоксидантного статуса тканей анадары: чем выше был их уровень, тем ниже была активность ключевых ферментов антиоксидантного комплекса – супероксиддисмутазы, каталазы, ферментов, сопряжённых с ресурсом восстановленного глутатиона [Gostyukhina et al., 2013; Soldatov et al., 2013, 2017].

По мнению ряда авторов, в условиях экспериментальной гипоксии анадара в течение первых часов поддерживает тканевое дыхание за счёт эндогенных ресурсов кислорода [Zwaan et al., 1995]. Роль такого депо могут выполнять каротиноиды: часть их ненасыщенных двойных связей [Карнаухов, 1988]. Каротиноиды, сопряжённые с окислительными ферментами (флавопротеиды, гемопротеиды), могут образовывать систему терминального окисления, в которой конечным акцептором электронов является оксигенированный каротиноид.

В настоящей работе в условиях эксперимента исследуется влияние аноксии на количественный и качественный состав каротиноидов тканей анадары с целью определить их участие в адаптации моллюска к бескислородной среде.

Материал и методика

Объектом исследования являлись двустворчатые моллюски *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), прежнее название – *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789). Животные были предоставлены для исследований мидийно-устричной фермой «Яхонт» ЛТД (район Качивели, южный берег Крыма). Продольный размер раковины – 3–4 см. Перед экспериментом две недели моллюски находились в садке. После

этого, они были перенесены в аквариальную, где содержались на естественном протоке в течение 4–5 дней. Особи были разделены на две группы: контрольную и опытную. Контрольная группа содержалась в условиях нормоксии ($5\text{--}6 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$), опытная – в условиях аноксии ($0 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) в течение трёх дней. Плотность посадки – 0.3 л особь^{-1} . В работе использовали 4 стеклянные ёмкости, в которые заливали по 2.4–2.5 л морской воды и помещали 8 моллюсков в каждую: контрольная группа, 1-е, 2-е и 3-и сутки эксперимента.

Содержание кислорода в воде понижали путём барботажа её азотом в течение 5 часов. Контроль над содержанием кислорода в воде осуществляли на протяжении всего эксперимента при помощи люминесцентного оксиметра HACH LDO 101. Раз в сутки воду в ёмкостях, где содержались моллюски, замещали на свежую для удаления метаболитов. Содержание кислорода в воде при этом сохранялось на прежнем уровне. Температура воды поддерживалась на уровне $16\text{--}17 \text{ }^\circ\text{C}$.

Животных для препарирования тканей и последующего биохимического анализа отбирали перед постановкой опыта, а также на 1-е, 2-е и 3-и сутки эксперимента. Процедура препарирования тканей (ноги, жабр, гепатопанкреаса – ГП), хранение полученных образцов проводились с соблюдением мер предосторожности, рекомендуемых при работе с пигментами [Maoka, Akimoto, 2008].

Суммарное содержание каротиноидов в тканях (далее ССК) определяли при помощи спектрофотометрического метода [Карнаухов, 1988]. Для разделения пигментов использовали методы тонкослойной (ТСХ), колоночной (КХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Подробное описание этих методов идентификации каротиноидов, а также применяемой при этом приборной базы было дано ранее [Maoka et al., 2011; Vorodina, 2016].

Суммарные каротиноиды разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC-6AD (L-6200 Intelligent pump with L-4250 UV-VIS detector Hitachi, Tokyo, Japan), снабжённом колонкой длиной 250 мм

и внутренним диаметром 4.6 мм с неподвижной фазой COSMOSIL 5SL-11 (растворитель ацетон : гексан (2:8), скорость подачи элюента 1.0 мл мин⁻¹, регистрация при 450 нм). При проведении HPLC для более точного разделения и идентификации применяли колонки с обращённой фазой (ODS), где в качестве элюента использовали хлороформ-метанол в соотношении 1:9 при скорости подачи образца 1.0 мл мин⁻¹. Сложные эфиры каротиноидов были предварительно выделены и подвержены реакции омыления в 10%-м растворе КОН в метаноле при комнатной температуре в течение 2 часов. После гидролиза образцы были также исследованы с помощью HPLC на колонке с ODS. Количественное содержание каротиноидов оценивали по результатам HPLC с учётом коэффициента экстинкции $E_{1\%}^{1\text{см}} = 2500$ при 450 нм. Масс-спектры (FAB MS) были получены на спектрометре JMS-NX 110A JEOL (Токуо, Япония), на матрице из мета-нитробензилового спирта. Спектры видимой области определяли на спектрофотометре U-2001, Hitachi (Токуо, Япония) в диэтиловом эфире (Et₂O).

При идентификации каротиноидов использовали их стандартные образцы из коллекции Research Institute for Production Development,

15 Shimogamo-morimoto-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-0805, Japan [Maoka et al., 2001; 2005; 2012], а также базу данных по масс-спектрам [Enzell, Bach, 1995; The Mass Spectrometry..., 2019] (анализ выполнен в Институте продуктов питания г. Киото, Япония, в 2015 г.).

Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводились при помощи стандартного пакета «Grapher-7». Результаты в таблицах и на рисунках представлены как $\bar{x} \pm S\bar{x}$. Сравнение выборочных совокупностей проводили на основе t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения цифровых массивов судили по критерию Пирсона. В работе использовано 32 моллюска: по 8 экземпляров на точку (контрольная группа, 1-е, 2-е и 3-и сутки эксперимента).

Полученные результаты

Идентификация каротиноидов в тканях анадары. В результате трехдневного эксперимента в условиях аноксии у особей анадары были получены суммарные экстракты ноги, гепатопакреаса и жабр, которые были подвергнуты разделению при помощи методов ТСХ и HPLC. На рисунке 1 представлены

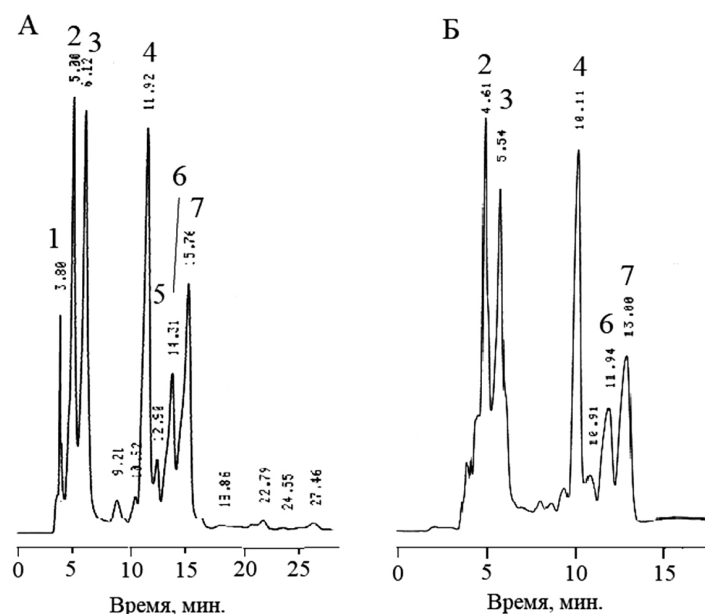


Рис. 1. HPLC-хроматограммы ноги моллюска в контроле (А) и конце опыта (Б). Номера пиков, соотнесённые с временем выхода каждой фракции, соответствуют: 1 – β-каротин; 2 – эфиры пектенолона; 3 – эфиры алло-, диато- и зеаксантинов; 4 – пектенолон; 5 – зеаксантин; 6 – диатоксантин; 7 – аллоксантин.

HPLC-хроматограммы ноги в контроле (А) и на 3-и сутки эксперимента (Б). Порядковый номер каротиноида, указанный в подписи, соответствует номерам, указанным по времени выхода фракции каротиноида на обоих хроматограммах. Не удалось идентифицировать 4–7% каротиноидов. Аналогичные результаты были получены по тканям ГП и жабр. Подобная идентификация была описана нами в ранее опубликованных работах [Vorodina, 2016; Vorodina, Soldatov, 2016]. В ходе настоящих исследований были идентифицированы: β -каротин; пектенолон; зеаксантин; диатоксантин; аллоксантин, а также эфиры пектенолона; алло- и диато-зеаксантинов.

Содержание и качественный состав каротиноидов ноги. Суммарное содержание каротиноидов (ССК) в ноге моллюска на начало эксперимента составляло 1.8–1.9 мг 100 г⁻¹ сырого веса (рис. 2). В 1-е сутки нахождения животных в условиях аноксии отмечали рост содержания пигментов в данном органе на 32–33% ($p < 0.05$). Однако затем происходило равномерное снижение значений данного

показателя. На 3-и сутки эксперимента содержание каротиноидов в ноге достигало минимальных значений – 1.3–1.4 мг 100 г⁻¹ сырого веса, что на 27–28% ниже ($p < 0.01$) контрольных величин.

Изменение качественного состава каротиноидов в ноге моллюска в течение экспериментальной аноксии представлено в таблице 1. Как видно, трёхсуточная аноксия приводила к исчезновению в данном органе β -каротина и зеаксантина. Доля эфиров пектенолона, алло-, диато- и зеаксантинов повышалась на 5–15% ($p < 0.05$). Уровень пектенолона и аллоксантина несколько понижался. Однако различия не были статистически выражены. Относительное содержание диатоксантина сохранялось на уровне контрольных значений.

Содержание и качественный состав каротиноидов жабр. В жабрах картина была принципиально иной. В первые двое суток эксперимента ССК сохранялось на уровне контрольных значений – 1.3–1.6 мг 100 г⁻¹ сырого веса (рис. 2). Однако на 3-и сутки данная величина повышалась более чем в 2 раза ($p < 0.01$)

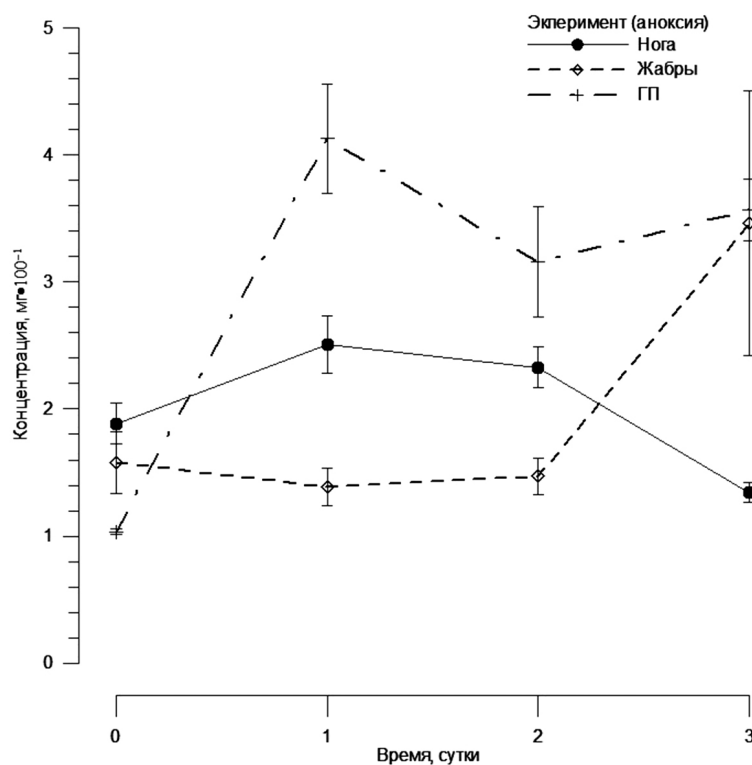


Рис. 2. Суммарное содержание каротиноидов (C_k) в различных тканях анадары.

Таблица 1. Содержание каротиноидов в ноге анадары (в % от ССК)

Виды каротиноидов	Продолжительность эксперимента, сутки			
	Контроль	1	2	3
β-каротин	2.0±0.3	3±0.7	2±0.2	–
Эфиры пектенолона	10.0±1.6	25±2.1	24.0±0.7	25.0±1.1
Эфиры алло-, диато-, зеаксантинов	15.0±0.6	20.0±1.2	21.0±1.4	20.0±0.9*
Пектенолон	27.0±0.9	23.0±0.7	23.0±0.9	23.0±1.1
Аллоксантин	25.0±1.9	15.0±0.9	18.0±0.7	21.0±1.1
Диатоксантин	11.0 ± 0.4	9.0±0.5	11.0±0.7	11.0±1.3
Зеаксантин	3.0 ± 0.4	1.0±0.2	1.0±0.2	–

Примечание: * эфиры зеаксантина не обнаружены.

и достигала 3.3–3.4 мг 100 г⁻¹ сырого веса. При этом орган приобретал кроваво-красную окраску (рис. 3). Эта реакция была отмечена у всех без исключения особей.

Изменение качественного состава каротиноидов в жабрах было близко к рассмотренному в отношении ноги (табл. 2). На 3-и сутки эксперимента β-каротин и зеаксантин в этом органе не определялись. Также существенно повышался уровень эфиров пектенолона на 9% ($p < 0.01$). Рост относительного содержания эфиров алло-, диато- и зеаксантинов был менее выражен. Изменение доли пектенолона, аллоксантина и диатоксантина было незначительно

и укладывалось в пределы статистической погрешности.

Каротиноиды моллюска по цветовой гамме можно разделить на группу розово-алого цвета и группу ярко-жёлтого цвета. В первую входят эфиры пектенолона и сам пектенолон (пектенолоновый комплекс), а основу второй составляют аллоксантин, диатоксантин, зеаксантин и их эфиры, а также β-каротин. Анализ соотношения этих групп показал явный рост содержания пектенолонового комплекса на 3-и сутки экспериментальной аноксии. Индекс красные/жёлтые составил 50:50, тогда как у контрольной группы только 36:64.



А

Б

Рис. 3. Окраска жабр анадары (А – контроль, Б – 3-и сутки эксперимента)

Таблица 2. Содержание каротиноидов в жабрах анадары (в % от ССК)

Виды каротиноидов	Продолжительность эксперимента, сутки			
	Контроль	1	2	3
β-каротин	4.4±0.3	4.5±0.3	1.0±0.2	–
Эфиры пектенолона	16.0±1.3	16.5±0.9	21.0±1.9	25.0±1.4
Эфиры алло-, диато-, зеаксантинов	19.5±1.5	17.1±1.0	20.0±1.8	23.0±1.3*
Пектенолон	21.9±0.9	21.5±1.3	23.0±1.8	25.0±0.9
Аллоксантин	21.6±1.5	20.4±0.9	22.0±1.3	20.0±0.4
Диатоксантин	10.0±0.4	12.0±0.9	10.0±0.6	7.0±1.4
Зеаксантин	2.0±0.4	2.0±0.2	2.0±0.7	–

Примечание: * эфиры зеаксантина не обнаружены

Содержание и качественный состав каротиноидов ГП. В отличие от ноги и жабр в ГП содержание каротиноидов повышалось уже в 1-е сутки эксперимента (рис. 1). Относительно контроля рост составил 4.1–4.2 раза ($p < 0.001$). В последующем он несколько понижался. Однако различия относительно 1-х суток эксперимента не были статистически значимы.

Характер изменения качественного состава каротиноидов в условиях аноксии в ГП был близок к рассмотренному выше. β-каротин и зеаксантин исчезали из ГП уже на 2-е сутки эксперимента (табл. 3). Доля эфиров пектенолона в данном органе увеличивалась на 13% ($p < 0.05$). Незначительный прирост отмечался и в отношении алло-, диато- и зеаксантинов

(3–4%). Уровень пектенолона и диатоксантина практически не изменялся, а доля аллоксантина незначительно понижалась. Все изменения находились в пределах статистической погрешности.

Обсуждение результатов

Из представленной выше информации следует акцентировать внимание на следующих результатах исследования:

- изменение ССК у анадары в условиях экспериментальной аноксии имеет выраженную тканевую специфику;
- в условиях аноксии в тканях существенно повышается относительное содержание эфиров пектенолона, а также отмечается незначи-

Таблица 3. Содержание каротиноидов в ГП анадары (в % от ССК)

Виды каротиноидов	Продолжительность эксперимента, сутки			
	Контроль	1	2	3
β-каротин	6.0±0.3	3.5±0.3	–	–
Эфиры пектенолона	10.0±1.3	16.5±0.9	24.0±1.9	23.0±1.4
Эфиры алло-, диато-, зеаксантинов	16.0±1.5	18.1±1.0	22.0±1.8*	20.0±1.3*
Пектенолон	24.8±0.9	21.5±1.3	23.0±1.8	24.0±0.9
Аллоксантин	20.5±1.5	18±0.9	19.0±1.3	17.0±0.4
Диатоксантин	13.0±0.4	11.0±0.9	12.0±0.6	15.0±1.4
Зеаксантин	2.7±0.4	1.0±0.2	–	–

Примечание: * эфиры зеаксантина не обнаружены

тельный рост уровня эфиров алло-, диато- и зеаксантинов;

- трёхсуточная аноксия сопровождается исчезновением зеаксантина и β -каротина из всех органов моллюска;

- покраснение жабр на 3-и сутки эксперимента.

Тканевая специфика ССК. Уровень ССК в тканях контрольной группы моллюсков был близким – 1–2 мг 100 г⁻¹ сырого веса. В течение эксперимента эта величина претерпевала существенные изменения. Различия были особенно заметны на 3-и сутки. На уровне респираторных поверхностей (жабры) ССК увеличивалось более чем в 2 раза. Учитывая способность ксантофилов к процессам оксигенации/деоксигенации при участии ксантиоксидазы [Карнаухов, 1988], эти изменения можно рассматривать как адаптационно значимые. Одновременно величина ССК понижалась в ноге моллюска, что, по-видимому, свидетельствовало о направленном перераспределении каротиноидов в рамках организма. Данное явление описано впервые. Каким образом осуществляется этот процесс сказать сложно. Можно лишь предположить, что в его основе лежит метаболическая трансформация пектенолона. Данный каротиноид не получается моллюском в процессе питания, а образуется из растительного диатоксантина. Это означает, что ткани анадары могут содержать ферментный комплекс, действие которого может быть направлено как на образование, так и разрушение пектенолона, что позволило бы осуществлять межтканевое перераспределение этого пигмента.

Нельзя исключать из внимания и процессы синтеза каротиноидных пигментов в гепатопанкреасе (ГП) анадары. ССК в этом органе в 1-е сутки эксперимента повышалась более чем в 4 раза. Объяснить это только ростом фильтрационной (пищевой) активности невозможно, так как при аноксии она существенно подавляется [Burnett, Stickle, 2001]. К тому же, при проведении эксперимента моллюски находились в условиях ограниченного объёма (2.4–2.5 л), который не мог обеспечить живот-

ных достаточным количеством пищевого субстрата. При этом биосинтетические процессы вполне реальны. Так, пектенолон имеет исключительно животное происхождение [Britton et al., 1998; Маока, 2011]. Он является результатом трансформации диатоксантина по схеме: диатоксантин \rightarrow пектенол $A \rightarrow$ пектенолон [Britton et al., 1998; Маока, 2011]. Пектенол A в минорных количествах ранее был зарегистрирован нами в тканях анадары [Borodina, Soldatov, 2016]. Аллоксантин в тканях анадары может иметь различное происхождение [Маока, 2011]. Однако свидетельств о его дальнейшей трансформации или же наличие предшествующих соединений, в отличие от многих других двустворчатых моллюсков, обнаружено не было. Зеаксантин образуется во многих видах микроводорослей черноморского фитопланктона и, скорее всего, накапливается в тканях анадары в процессе фильтрационного питания. Аналогично относительно диатоксантина и β -каротина [Маока, 2011].

Рост содержания эфиров. Рост содержания эфиров каротиноидов в условиях экспериментальной аноксии отмечали во всех исследуемых тканях анадары. Этот процесс, по-видимому, был следствием адаптивной перестройки тканевого метаболизма в условиях анаэробноза. Чтобы избежать накопления в тканях лактата и сукцината и вызванного этим развития локального ацидоза многие моллюски подавляют активность пируваткиназы посредством ее фосфорилирования [Michaelidis et al., 1999]. Процесс развивается в течение 12-часовой аноксии и сопровождается существенным повышением содержания в тканях жирных кислот [Michaelidis et al., 1999; Fokina et al., 2007]. Каротиноиды в этом случае можно рассматривать как дополнительную ёмкость. Связывая определённое количество свободных жирных кислот, они тем самым поддерживают данную направленность метаболизма в тканях.

Как следует из полученных результатов, в большей степени реакции этерификации подвергалась молекула пектенолона. Содержание эфиров данного пигмента на 3-и сутки эксперимента было на 9–15% ($p < 0.05$) выше

относительно контрольной группы моллюсков. Рост же уровня эфиров среди алло-, диато- и зеаксантинов не превышал 5%. Повышенная этерификация пектенолона, возможно, обусловлена его самым высоким содержанием в тканях анадары (22–27%) относительно других пигментов.

Ранее нами было показано, что для анадары, обитающей в черноморском регионе, видоспецифичным каротиноидом является пектенолон, который накапливается у этого моллюска во всех тканях в двух изомерных формах (9-цис и транс-), в сложноэфирном и свободном состоянии, с суммарной концентрацией, сопоставимой с суммой всех других каротиноидов [Бородина, Солдатов, 2014]. Он не получается моллюском в процессе фильтрационного питания, а является результатом метаболической трансформации: диатоксантин → пектенол $A \rightarrow$ пектенолон. Целесообразность направленного синтеза данного каротиноида, по-видимому, определяется тем, что в сравнении с другими пигментами каротиноидного ряда он более эффективно связывает кислород [Terao, 1989].

Исчезновение зеаксантина и β -каротина. Анализ качественного состава каротиноидов в органах анадары показал, что доля зеаксантина в них не превышала 3%, а β -каротина – 6%. Известно, что данные каротиноиды локализованы преимущественно в мембранных структурах оболочек клеток. β -каротин находится в гидрофобном слое цитоплазматической мембраны, а молекула зеаксантина расположена перпендикулярно липидному бислою, так что её циклогексановые кольца граничат с гидрофильно-гидрофобными поверхностями клетки [Rice-Evans et al., 1997]. Показано активное участие зеаксантина в трансмембранном переносе электронов, протонов и кислорода [Поляков, Лешина, 2006]. Отмечена отрицательная коррелятивная связь между содержанием данного каротиноида в тканях анадары и активностью ряда антиоксидантных ферментов [Soldatov et al., 2013; 2017].

Причин исчезновения зеаксантина и β -каротина в тканях моллюска в течение 3-суточной

аноксии может быть несколько. Учитывая низкий уровень фильтрационной активности моллюсков в течение эксперимента, можно допустить крайне ограниченное поступление β -каротина и зеаксантина в организм анадары и, как следствие, исчезновение в тканях обоих пигментов. При этом часть зеаксантина подвергалась процессам этерификации, о чём было сказано выше.

Следует принять во внимание, что аноксия оказывает существенное влияние и на состояние цитоплазматических мембран. Отмечено снижение их проницаемости [Hochachka et al., 1996] и микровязкости [Фокина и др., 2011]. При этом происходит изменение конформации C_{40} -каротиноидов при «сбросе» кислорода [Максимов и др., 2007], что может способствовать их вымыванию и последующей химической трансформации.

Покраснение жабр. Увеличение доли красных пигментов (пектенолоновый комплекс) в жабрах моллюсков на 3-и сутки аноксии функционально оправдано. Считается, что пектенолон более эффективен в связывании и транспорте кислорода относительно других пигментов [Terao, 1989]. Это должно повышать диффузионную способность водно-гематического барьера. Однако это, по-видимому, не является решающим фактором, который может повлиять на изменение окраски жаберной ткани. Не следует исключать из внимания и вариант гиперемии (отёка). Как уже отмечалось, гемолимфа анадары содержит эритроцитарный гемоглобин [Cortesi et al., 1992; Holden et al., 1994], что также может придать жабрам при отёке соответствующую окраску. Этому может способствовать снижение вязкости цитоплазматических мембран, отмеченное у моллюсков в условиях аноксии [Фокина и др., 2011] и, как следствие, приводить к нарушению целостности жаберного лакунарного эпителия, что должно сопровождаться локальными кровоизлияниями. Случаи гиперемии жаберной ткани в условиях токсического воздействия ранее были отмечены у костистых рыб [Лукин и др., 2010]. Можно допустить, что подобное действие может оказать и аноксия.

Заключение

Представленная информация позволяет сделать ряд обобщений. В условиях 3-суточной экспериментальной аноксии каротиноиды в организме анадары перераспределяются в пользу респираторных поверхностей. В жабрах увеличивается доля розово-алых пигментов: пектенолон и его эфиры (пектенолоновый комплекс). Во всех исследованных органах в условиях аноксии существенно повышается относительное содержание эфиров пектенолона, а также отмечается незначительный рост уровня эфиров алло-, диато- и зеаксантинов. Это, по-видимому, позволяет поддерживать анаэробную ориентацию метаболизма, сопровождающуюся продукцией свободных жирных кислот. Из всех тканей исчезает зеаксантин и β -каротин, что, вероятно, является следствием ограничения фильтрационного питания моллюсков.

Благодарности

Авторы выражают признательность коллегам из Research Institute for Production Development (Kyoto, Japan) и лично доктору Т. Маока за методическую помощь при проведении настоящих исследований.

Финансирование работы

Работа выполнена по теме государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом». Рег. номер АААА-А 18-118021490093-4.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

Все экспериментальные протоколы были выполнены в соответствии с руководящими принципами ЕС по использованию лабораторных животных и уходу за ними (86/609 / СЕЕ) и при соблюдении правил, утверждённых

распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980 N 12000-496 и приказом Минвуза СССР от 13 сентября 1984 N 22. Все усилия были предприняты, чтобы использовать только минимальное количество животных, необходимое для получения надёжных научных данных.

Литература

- Бородина А.В., Солдатов А.А. Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков // Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии / Под ред. Г.Е. Шульмана, А.А. Солдатов; НАН Украины, Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. Севастополь, 2014. Гл. 3. С. 87–168.
- Иванов Д.А., Синегуб И.А. Трансформация биоценозов Керченского пролива после вселения хищного моллюска *Rapana thomasiana* и двустворчатых *Mya arenaria* и *Cunearca cornea* // Современные проблемы экологии Азово-Черноморского региона. Материалы III Международной конференции. (г. Керчь, 10–11 октября 2007). Керчь, 2008. С. 45–51.
- Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука, 1988. 240 с.
- Киселёва М.И. Сравнительная характеристика донных сообществ у берегов Кавказа // Многолетние изменения зообентоса Чёрного моря. Киев: Наук. думка, 1992. С. 84–99.
- Лукин А.А., Шарова Ю.Н., Беличева Л.А. Оценка состояния организма рыб при загрязнении водных экосистем нефтепродуктами и отходами целлюлозно-бумажного производства // Рыбное хозяйство. 2010. № 6. С. 47–52.
- Максимов Г.В., Волков В.В., Паршина Е.Ю. Исследование конформации каротиноидов в миелиновом нерве при изменении содержания кислорода // ДАН. 2007. Т. 417. № 3. С. 407–409.
- Маринов Т.М. Зообентос Болгарского сектора Чёрного моря. София: Изд-во Болгарской академии наук, 1990. 195 с.
- Поляков Н.Э., Лёшина Т.В. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование // Успехи химии. 2006. Т. 75. № 12. С. 1175–1192.
- Ревков Н.К. Недавний вселенец и перспективный объект аквакультуры в Чёрном море двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906): особенности развития поселений у берегов Крыма // Материалы VIII Всес. конф. по пром. беспозвоночным (Калининград, 2–5 сент. 2015 г.). Калининград, 2015. С. 254–257.
- Ревков Н.К. Особенности колонизации Чёрного моря недавним вселенцем – двустворчатым моллюском *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) // Морской биологический журнал. 2016. Т. 1. № 2. С. 3–17.

- Фокина Н.Н., Нефёдова З.А., Немова Н.Н. Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (обзор) // Тр. КарНЦ РАН. 2011. № 3. С. 121–130.
- Шиганова Т.А. Чужеродные виды в экосистемах южных внутренних морей Евразии: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2009. 56 с.
- Borodina A.V. Effect of food deprivation on transformation of carotenoids in the bivalve mollusc *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // J. Evolutionary Biochem. Physiology. 2016. Vol. 52. No. 4. P. 282–291.
- Borodina A.V., Soldatov A.A. The qualitative composition of carotenoids and their seasonal dynamics in tissues of the bivalve *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Russian Journal of Marine Biology. 2016. Vol. 42. No. 2. P. 166–177.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids. Biosynthesis and Metabolism. Basel: Birkhäuser Verlag, 1998. Vol. 3. 414 pp.
- Broom M.J. The biology and culture of marine bivalve molluscs of the Genus *Anadara* // ICLARM studies and reviews. 1985. Vol. 12. 37 pp.
- Burnett L.E., Stickle W.B. Physiological Responses to Hypoxia // Coastal Hypoxia: Consequences for Living Resources and Ecosystems. Coastal Estuarine Studies. 2001. P. 101–114.
- Cortesi P., Cattani O., Vitali G., Carpena E., Zwaan A., Thillart G. Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* to hypoxia and cadmium exposure: Erythrocytes versus other tissues // Marine Coastal Eutrophication. 1992. P. 1041–1054.
- Enzell C. R., Bach S. Mass spectrometry of carotenoids / Eds G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H.P. Pfander. Carotenoids, Birkhauser Verlag, Basel, Switerland. 1995. Vol. 1B. P. 261–320.
- Fokina N., Nemova N., Nefedova Z. Fatty acid composition of mussels *Mytilus edulis* under short-term anoxia // Chemistry and physics of lipids. Abstracts from 48th International Conference on the Bioscience of Lipids (Turku, Finland, 4–8 Sept. 2007). Turku, 2007. Vol. 149. P. 60.
- Gostyukhina O.L., Soldatov A.A., Golovina I.V., Borodina A.V. Content of carotenoids and the state of tissue antioxidant enzymatic complex in bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* Br. // J. Evolutionary Biochem. Physiol. 2013. Vol. 49. No. 3. P. 309–315.
- Hochachka P.W., Bick L.T., Doll C.J., Land S.C. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 9493–9498.
- Holden J.A., Pipe R.K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis* // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1994. Vol. 74. No. 2. P. 287–299.
- Maoka T. Carotenoids in Marine Animals // Marine Drugs. 2011. Vol. 9. No. 2. P. 278–293.
- Maoka T., Akimoto N. Natural product chemistry in carotenoid, some experimental techniques for structural elucidation and analysis of natural carotenoids // Carotenoid Sci. 2008. Vol. 13. P. 10–17.
- Maoka T., Etoh T., Borodina A.V., Soldatov A.A. A series of 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin Derivatives from the Sea Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Grown in Black Sea, Ukraine // J. Agric. Food Chem. 2011. Vol. 59. P. 13059–13064.
- Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. Carotenoids in three species of corbicula Clams, *Corbicula japonica*, *Corbicula sandai*, and *Corbicula sp.* (Chinese fresh water corbicula clam) // J. Agric. Food Chem. 2005. Vol. 53. P. 8357–8364.
- Maoka T., Hashimoto K., Akimoto N., Fujiwara Y. Structures of five new carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas* // J. Nat. Prod. 2001. Vol. 64. P. 578–581.
- Maoka T., Ochi J., Mori M., Sakagami Y. Identification of carotenoids in the freshwater shellfish *Unio douglasiae nipponensis*, *Anodonta lauta*, *Cipangopaludina chinensis laeta*, and *Semisulcospira libertina* // J. Oleo Sci. 2012. Vol. 61. P. 69–74.
- Michaelidis B., Pallidou A., Vakouftsi P. Effects of anoxia on the extra- and intracellular acid-base status in the land snail *Helix lucorum* (L.): lack of evidence for a relations hip between pyruvat kinase down-regulation and acid-base status // J. Exp. Biol. 1999. Vol. 202. P. 1667–1675.
- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds // Trends in plant Science. 1997. Vol. 2. No. 4. P. 152–159.
- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Golovina I.V., Stolbov A.Ya. Peculiarities of organization of tissue metabolism in mollusks with different tolerance to external hypoxia // J. Evolutionary Biochem. Physiol. 2010. Vol. 46. No. 4. P. 341–349.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Borodina A.V., Golovina I.V. Glutathione Antioxidant Complex and Carotenoid Composition in Tissues of the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // J. Evolutionary Biochem. Physiol. 2017. Vol. 53. No. 4. P. 289–297.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Borodina A.V., Golovina I.V. Qualitative composition of carotenoids, catalase and superoxide dismutase activities in tissues of the bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) // J. Evolutionary Biochem. Physiol. 2013. Vol. 49. No. 4. P. 389–398.
- Terao J. Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution // Lipids. 1989. Vol. 24. No. 7. P. 659–661.
- The Mass Spectrometry Society of Japan (MSSJ). (электронная база масс-спектров) // (<http://www.massbank.jp/Search>). Проверено 17.05.2019.
- Zwaan A., Babarro J.M.F. Anoxic survival potential of bivalves: (arte)facts // Comp. Biochem. Physiol. 2002. Vol. 131. No. 3. P. 615–624.
- Zwaan A., Isani G., Cattani O., Cortesi P. Long-term anaerobic metabolism of erythrocytes of the arcid clam *Scapharca inaequivalvis* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1995. Vol. 187. No. 1. P. 27–37.

THE INFLUENCE OF ANOXIA ON THE CONTENT AND COMPOSITION OF CAROTINOIDS IN THE TISSUES OF THE BIVALVE INVADER *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© 2019 Borodina A.V.^{a,*}, Soldatov A.A.^{a,b,**}

^aFSBIS IMBI RAS, Sevastopol, 299011, the Russian Federation;

^bFSAU EI of Higher Education “Sevastopol State University”,

Sevastopol, 299053 the Russian Federation;

e-mail: *borodinaav@mail.ru, **alekssoldatov@yandex.ru

Under the experimental conditions, the influence of experimental anoxia on the content and qualitative composition of carotenoids in the tissues of the bivalve invader *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) was investigated. The oxygen content in the water was lowered by bubbling it with nitrogen for 5 hours. Exposure lasted three days. Tissue samples (gills, foot, hepatopancreas) were taken before the experiment (control), as well as on the 1st, 2nd and 3rd day of the experiment. The water temperature was maintained at 16–17 °C. It is shown that through anoxia, carotenoids are redistributed in favor of respiratory surfaces. In the gills, the proportion of pink-scarlet pigments increases: pectenolone and its esters (pectenolone complex). In all studied organs under anoxia conditions, the relative content of pectenolone esters significantly increases, and there is also a slight increase in the levels of allo-, diatho-, and zeaxanthin esters.

Key words: anoxia, carotenoids, *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), Black Sea.