

УДК 594:577.127(262.5)

ДИНАМИКА КАРОТИНОИДОВ В ТКАНЯХ МОЛЛЮСКА-ФИЛЬТРАТОРА *CERASTODERMA GLAUCUM* (BRUGUIERE, 1789) В ГОДОВОМ ЦИКЛЕ

© 2020 г. А. В. Бородина^{1,*}, П. А. Задорожный²

¹ ФИЦ ИнБЮМ РАН, 299011 Севастополь, Россия

² Институт химии ДВО РАН, 690022 Владивосток, Россия

*e-mail: borodinaav@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2019 г.

После доработки 29.07.2019 г.

Принята к публикации 10.10.2019 г.

Исследована годовая динамика каротиноидов моллюска-фильтратора *Cerastoderma glaucum*, обитающего в Казачьей бухте Черного моря. Состав каротиноидов представлен 11 свободными и 4-мя этерифицированными каротиноидами. В течение всего года в тканях присутствуют β-каротин, гетероксантин и мактраксантин, а также эфиры последних двух каротиноидов, их суммарная доля составила 50–65% от суммы каротиноидов. Видоспецифичным каротиноидом является мактраксантин. Присутствие оставшихся фракций каротиноидов непостоянно и подвержено сезонным колебаниям. Выявлены отличия в составе каротиноидов у *C. glaucum* в сравнении с видами рода *Cerastoderma* из других ареалов обитания. Обсуждаются отличия в составе каротиноидов с другим моллюском-фильтратором: *A. kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Несмотря на сходный тип питания и место обитания, качественный состав и сезонные изменения содержания каротиноидов у этих двух видов существенно различаются.

Ключевые слова: сезонная динамика каротиноидов, моллюски-фильтраторы, *Cerastoderma glaucum*, Черное море, мактраксантин, трансформация каротиноидов, *Anadara kagoshimensis*

DOI: 10.31857/S0044452920010027

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды – пигменты автотрофного, в основном, растительного происхождения, которые в тканях консументов (последующих звеньях пищевой цепи) подвергаются накоплению и метаболической трансформации в соответствии с видовой спецификой трофического звена. В растительной клетке каротиноиды играют важную роль в процессе фотосинтеза, фотозащиты, выполняют антиоксидантную и другие функции. У животных функции этих соединений являются предметом интенсивного изучения, в настоящее время известны антиоксидантная, гепатопротекторная, мембранно-стабилизирующая и другие свойства каротиноидов [1, 2]. На сегодняшний день установлено строение более 750 природных соединений каротиноидного ряда, однако их метаболическая трансформация, происходящая в каждом трофическом звене, остается все еще малоизученной [2]. При этом открываются широкие возможности как в поиске и обнаружении новых соединений, так и выяснения функциональной значимости этих БАВ у изучаемых видов.

Массовый черноморский вид *Cardium* (= *Cerastoderma*) *lamarki* *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789)

(в ранних работах *Cardium edule* Linnaeus, 1758, *Cerastoderma lamarki* Reeve, 1843) широко распространен в акватории Черного моря, его обитание на илистом грунте побережья Севастополя были отмечены еще С.А. Зерновым в 1910 г. [3, 4]. Моллюск средиземноморского происхождения считается коренным представителем черноморской малакофауны [5]. Он относится к эвригалинному виду, однако избегает солёности ниже 8‰, часто встречается в местах с кратковременным сероводородным заражением, при этом отсутствует в местах с пониженным содержанием кислорода и постоянным сероводородным заражением [4]. По типу питания этот моллюск относится к типичному облигатному сестенофагу, однако при увеличении пищевой конкуренции он может питаться из водной толщи [6]. Исследования последнего столетия показали, что под действием абиотических и биотических факторов моллюски рода *Cerastoderma* имеют значительную межвидовую изменчивость, которая позволяет им адаптироваться к обновляющимся экологическим условиям существования [7]. Исследования каротиноидного состава *Cerastoderma glaucum* очень скудны: в 70–80-х годах прошлого столетия эта информация ограничивалась исследованиями этого вида, обитающего на

Британских островах [8, 9]. Были высказаны предположения о наличии в составе этого вида сложноэфирных фракций каротиноидов, β -каротина, лютеина и комплекса ксантофиллов неустановленного строения [8, 9]. Среди последних в гепатопанкреасе моллюска предположительно был идентифицирован гетероксантин [9]. Факторы, влияющие на метаболизм каротиноидов, например, места обитания и сезонность [10], не исследованы. В 2017 г. нами был впервые изучен состав каротиноидов моллюска *C. glaucum*, обитающего на Севастопольском побережье [11]. В этой работе были обнаружены отличия в составе каротиноидов этого моллюска от описанного ранее в [8–10].

Одним из наиболее успешных среди двустворчатых моллюсков-фильтраторов по адаптации к изменяющимся внешним условиям обитания является вселенец в Черное море *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). У этого моллюска выражена устойчивость к гипоксии, разного рода биотическим и абиотическим загрязнениям, пищевой депривации, что связано с эффективной работой антиоксидантной системы и гемоглобина [12–14]. По типу и способу питания он близок к *C. glaucum*, так как тоже обитает в разрыхленном грунте и фильтрует образующуюся взвесь, для передвижения также использует свою ногу, которая у этого моллюска не только обеспечивает ему активный образ жизни, но и имеет ряд физиологических и метаболических особенностей [13]. Исследования состава каротиноидов *A. kagoshimensis*, обитающего в Черном море, происходили на протяжении ряда лет [16, 17]. Были обнаружены некоторые отличия как в качественном составе каротиноидов, так и в их соотношении, по сравнению с видовым аналогом из Тихоокеанского региона, это же было отмечено и для каротиноидного состава черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* [16]. В связи с этим для углубления понимания функциональной роли каротиноидов в физиологических процессах моллюсков важно отметить необходимость изучения как каротиноидного состава массовых видов моллюсков, так и изучения факторов, влияющих на этот метаболизм.

Целью данной работы явилось изучение влияния сезонности на накопление и метаболизм каротиноидов в тканях моллюска-фильтратора *C. glaucum*, обитающего в Черном море, и сопоставление этих данных с данными для сходного по типу питания и условиям обитания вида *A. kagoshimensis*, исследованного нами ранее.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования являлись двустворчатые моллюски-фильтраторы *Cerastoderma glaucum* (Bruguère, 1789), обитающие в Казачьей бухте г. Севастополя. Пробы отбирали ежемесячно на протяжении 2018 г. [18], кроме августа месяца.

Причинами этого были высокая температура и влажность воздуха, приведшая к деструкции пигментов [18]. Количество экземпляров, отобранных в течение месяца (одна точка отбора), составило от 5 до 15.

Лабораторная обработка тканей моллюсков для определения суммарного содержания каротиноидов (ССК) и дальнейшего проведения тонкослойной хроматографии (ТСХ), подготовка и хранение проб проводились с соблюдением мер предосторожности, рекомендуемых при работе с пигментами [18].

Спектрофотометрические методы. Мягкие ткани гомогенизировали, содержание суммарных каротиноидов измеряли, как описано в [19]. ССК определяли спектрофотометрическим методом. Спектры общего экстракта каротиноидов и индивидуальных фракций записывали на спектрофотометре СФ-2000.

Суммарный экстракт каротиноидов для дальнейшего разделения и идентификации методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (МС) запаивали в ампулы в атмосфере азота и транспортировали в Институт химии ДВО РАН при низкой температуре.

Хроматографические методы и масс-спектрометрия. Разделение пигментов проводили методами ТСХ и ВЭЖХ. При проведении ТСХ использовали пластины фирмы “Sorbfil” (Россия, Краснодар). Ацетоновые экстракты мягких тканей моллюска упаривали в вакууме, растворяли в хлороформе и разделяли на пластинках с силикагелем в системе: ацетон:гексан (2:8). Разделение пигментов проводилось при температуре воздуха 18–20°C.

ВЭЖХ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 с детектором со встроенной фотодиодной матрицей SPD-M20A, на колонке ZorbaxSil 250*4.6 мм, скорость потока элюента 1 мл/мин, в градиенте гексан-ацетон (0–20 мин гексан:ацетон 8:2, с 20 по 25 мин градиент до 80% ацетона в системе, 25–35 мин – гексан:ацетон 2:8). Фракции основных каротиноидов собирали (примерно 10–15 разделений), объединяли, упаривали досуха на роторном испарителе при 40°C, перерастворяли в метаноле и записывали масс-спектр с помощью масс-спектрометрического детектора низкого разрешения Shimadzu LCMS-2010EV, источник APCI, режим регистрации положительных ионов. Концентрации индивидуальных каротиноидов определяли с помощью ВЭЖХ, результаты концентрации 0.3% и ниже отмечены как “следы”. Оценка количественного содержания каротиноидов была основана на результатах ВЭЖХ с учетом коэффициента $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 2500 при 450 нм. Соотношение максимумов III/II, % в спектрах поглощения рассчитывали, как описано в [20].



Рис. 1. Фото моллюска *C. glaucum*. Сентябрь 2018.

Омыление каротиноидов проводили, перерабатывая их в 5%-ном растворе КОН в метаноле.

Статистический анализ. Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводились при помощи пакета “Grapher-7”. Результаты расчета суммарных каротиноидов представлены как среднее арифметическое (\bar{x}) и стандартная ошибка средней ($S\bar{x}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Каротиноиды *C. glaucum*. Внешний вид моллюска свидетельствует о хорошо развитой ноге, окрашенной в яркий (как правило) оранжевый цвет (рис. 1), вероятней всего, связанный с повышенным содержанием каротиноидов. С учетом массо-размерных характеристик внутренних органов, уровень ССК в ноге уступает лишь гепатопанкреасу, что характерно для большинства двустворчатых моллюсков (рис. 2). Отметим, что в жабрах содержится только относительно небольшая доля ССК. На рис. 3 показана годовая динамика суммарных каротиноидов *C. glaucum*. Максимальное накопле-

ние каротиноидов происходит весной и небольшое колебание в сторону увеличения отмечено в августе–сентябре. Изменение содержания ССК в тканях зависит от общего ССК в организме в целом и также подвержено сезонным и другим колебаниям. Увеличение ССК в мягких тканях моллюска совпало с периодом созревания гонад и нерестом. Гонады окрашены в ярко желтый-оранжевый цвет и их хорошо видно на рис. 1.

Идентификация каротиноидов была проведена с помощью спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях, хроматографических и масс-спектрометрических данных:

β -каротин – время удерживания (R_t) 2.72 мин, максимумы поглощения в элюенте (λ_{max}) 425, 449, 479, отношение %III/II 41, масса иона [M + H] + 537;

Эфир гетероксантина – R_t 2.88 мин (30.5 мин после омыления), λ_{max} 426, 447, 477, %III/II 42;

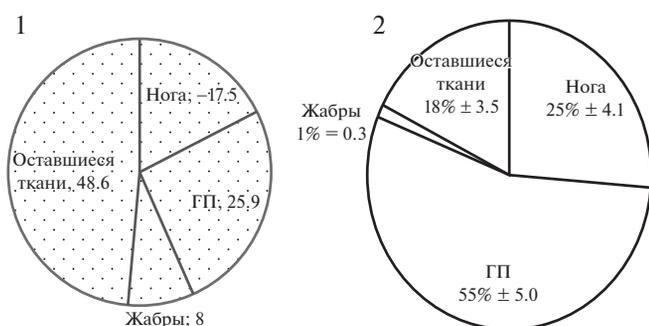


Рис. 2. Весовые характеристики *C. glaucum*-1; Распределение суммарного содержания каротиноидов по тканям *C. glaucum*-2.

Суммарное содержание каротиноидов, мг 100^{-1} г.

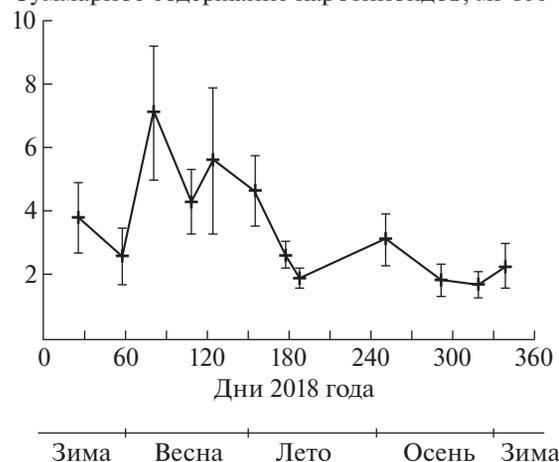


Рис. 3. Годовая динамика суммарного содержания каротиноидов *C. glaucum*.

Эфир мактраксантина – Rt 2.95 мин (33.0 мин после омыления), λ_{\max} 418, 441, 470, %III/II 88, [M + H] + 637 (после омыления);

Эфир фукоксантина – Rt 3.73 мин, λ_{\max} 448, (468), %III/II 0;

Эфир мактраксантина – Rt 3.89 мин (32.8 мин после омыления), λ_{\max} 417, 441, 470, %III/II 90, [M + H] + 637 (после омыления);

Лютеин – Rt 12.98 мин, λ_{\max} 424, 446, 475, %III/II 66, [M + H] + 569;

Зеаксантин – Rt 13.82 мин, λ_{\max} 451, 478, %III/II 16, [M + H] + 569;

Диатоксантин – Rt 14.70 мин, λ_{\max} 449, 476, %III/II 62;

Аллоксантин – Rt 15.60 мин, λ_{\max} 424 448, 477, %III/II 68;

Диадиноксантин – Rt 18.34 мин, λ_{\max} 424, 446, 475, %III/II 66, [M + H] + 583;

Фукоксантин – Rt 25.00 мин, λ_{\max} 449, (469), %III/II 0, %III/II 66, [M + H] + 659, [M+Na]+ 681, выделенная фракция неразделима со стандартом, выделенным из *Laminaria* sp.;

Виолаксантин – Rt 26.31 мин, λ_{\max} 418, 441, 471, %III/II 92, [M + H] + 601;

Неоксантин – Rt 29.10 мин, λ_{\max} 415, 438, 461, %III/II 80, [M + H] + 601;

Гетероксантин – Rt 30.45 мин, λ_{\max} 425, 449, 478, %III/II 58, [M + H] + 601;

Мактраксантин – Rt 32.88 мин, λ_{\max} 418, 442, 471, %III/II 91, [M + H] + 637;

Всего обнаружено и идентифицировано 11 свободных и 4 фракции этерифицированных каротиноидов. Ежемесячная динамика содержания индивидуальных каротиноидов представлена в табл. 1.

В течение годового цикла в тканях моллюска постоянно присутствовали β -каротин, мактраксантин, гетероксантин и эфиры двух последних каротиноидов, они составляли около 50–60% от суммы всех пигментов. Ряд каротиноидов у *C. glaucum* присутствовал не постоянно, а только в отдельные месяцы – это зеаксантин, лютеин, диадиноксантин, диатоксантин, аллоксантин и фукоксантин, включая его эфир, которые составляют в сумме около 10–20%. С учетом неидентифицированных каротиноидов (6–22%) реальная суммарная доля минорных фракций существенно выше. В течение года можно выделить период увеличения их суммарного количества (с марта по июль), затем небольшое снижение и изменение в качественном составе (июль–сентябрь), после чего в октябре–ноябре снова рост их количества (табл. 1).

Каротиноиды *A. kagoshimensis*. На основании проведенных ранее исследований по изучению влияния фактора сезонности на изменение состава каротиноидов в индивидуальных тканях моллюс-

ка-фильтратора *A. kagoshimensis*, обитающего на Севастопольском побережье Черного моря [17], мы представляем динамику каротиноидов для организма моллюска в целом (табл. 2). Дополнением к этой таблице могут быть данные по гонадам, полученные в 2015 г. в период нереста моллюска (июль–август) [21]. В этот период отсутствовал пектенол А, на фоне увеличения содержания пектенолона, а уровень суммарных каротиноидов снижался до $3.9 \pm 0.5 \text{ мг} \cdot 100^{-1}$ [21].

ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика суммарных каротиноидов. Исследования ССК у *C. glaucum* показало увеличение этого показателя в весенний и осенний периоды (рис. 3), что скорее всего вызвано сменой состава фитопланктона и бентосных водорослей [22]. После зимы, с появлением все более теплых и солнечных дней, происходит максимальное развитие как микроводорослей, так и зоопланктона, что обеспечивает разнообразную кормовую базу для бентосных моллюсков-фильтраторов [22]. У *C. glaucum* с апреля–мая начинают созревать гонады [23], что также влияет на увеличение ССК, вплоть до нереста. В нерестовый период происходит активное участие каротиноидов в различных процессах: от репродуктивных до защитных, восстановительных клеточных механизмов, поэтому летом, в разгар нереста, мы наблюдаем некоторое снижение уровня ССК в организме моллюска. В сентябре наступает смена температурных режимов, происходящие апвелинги приводят к обогащению вод питательными веществами и, как следствие, наступают смена состава фитопланктона и его бурное развитие [22]. По всей вероятности, с этим связан второй максимум в годовой динамике суммарных каротиноидов *C. glaucum*. Его невысокие показатели скорее всего вызваны нивелирующим влиянием нереста этих моллюсков в данный период.

Несколько иначе выглядит зависимость содержания ССК у анадары от зимнего, весеннего и летнего сезона [16]. Как было отмечено ранее, для этого вида характерно увеличение содержания каротиноидов в феврале и в мае–июне, что по времени совпадает с развитием диатомовых микроводорослей, их двустадийной сукцессией, о чем сообщалось ранее [16]. В период нереста также для этого вида моллюсков было отмечено некоторое снижение общего уровня ССК.

Динамика качественного состава каротиноидов. Состав каротиноидов моллюска *C. glaucum* представлен 11-ю соединениями и 4-мя их эфирами. Структурные формулы приведены на рис. 4. Большинство каротиноидов *C. glaucum* относятся к растительным пигментам, которые может получить моллюск с пищей, профильтровывая фитопланктон. Так, например, β -каротин характерен для многих видов микроводорослей, относящихся к

Таблица 1. Динамика каротиноидов у моллюска *C. glaucum* в течение 2018 г.

№ п/п	Название каротиноида	Концентрация каротиноида в тканях <i>Cerastoderma glaucum</i> , в % за каждый месяц 2018 г.											
		январь	февраль	март	апрель	май	июнь	июль	сентябрь	октябрь	ноябрь	декабрь	
1	β -каротин	5.5 ± 0.7	7.7 ± 1.1	7.0 ± 1.2	6.8 ± 0.9	6.5 ± 1.3	4.6 ± 0.8	5.6 ± 1.2	3.7 ± 0.6	4.1 ± 0.8	2.8 ± 0.4	3.2 ± 0.4	
2	Эфир гетероксантина	0.7 ± 0.5	1.1 ± 0.4	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.8	1.1 ± 0.6	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	следы	следы	следы	
3	Эфир мактраксантина	23.3 ± 2.4	20.6 ± 1.2	22.3 ± 1.6	23.6 ± 1.8	24.7 ± 1.6	23.5 ± 2.0	22.8 ± 3.4	31.3 ± 3.2	25.5 ± 3.2	19.8 ± 1.6	26.0 ± 3.0	
4	Эфир фукоксантина	0.9 ± 0.4	1.8 ± 0.6	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.2	следы	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.3	
5	Эфиры мактраксантина	4.5 ± 1.1	1.7 ± 0.6	2.3 ± 1.0	2.6 ± 0.6	3.0 ± 0.7	12.7 ± 3.5	13.8 ± 4.1	6.6 ± 2.2	7.2 ± 3.2	7.8 ± 2.8	7.4 ± 1.4	
6	Лютеин	2.8 ± 0.4	4.6 ± 1.2	3.0 ± 0.7	2.0 ± 0.7	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3	
7	Зеаксантин	0.9 ± 0.3	1.4 ± 1.3	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.3	следы	0.4 ± 0.1	следы	—	—	0.4 ± 0.1	
8	Диатоксантин	5.2 ± 1.1	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.3	3.2 ± 0.6	0.6 ± 0.2	3.1 ± 0.8	5.5 ± 0.9	8.8 ± 2.3	
9	Аллоксантин	11.3 ± 2.1	2.8 ± 0.3	2.6 ± 0.5	2.5 ± 0.6	2.4 ± 1.1	0.8 ± 0.4	2.3 ± 0.9	3.2 ± 0.6	7.6 ± 1.8	12.2 ± 2.2	20.1 ± 2.6	
10	Диадиноксантин	4.0 ± 0.6	5.8 ± 0.4	6.7 ± 1.4	7.3 ± 0.9	7.8 ± 2.2	2.1 ± 0.6	1.1 ± 0.5	1.5 ± 1.2	2.2 ± 0.6	2.9 ± 0.8	2.3 ± 0.8	
11	Фукоксантин	4.5 ± 1.0	8.7 ± 2.1	6.3 ± 1.8	5.2 ± 0.4	4.4 ± 0.6	1.8 ± 0.5	2.1 ± 0.3	следы	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.4	следы	
12	Виолаксантин	0.7 ± 0.5	1.4 ± 0.8	—	—	—	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	—	—	—	
13	Неоксантин	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.3	—	—	—	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.6	следы	—	—	—	
12	Гетероксантин	25.0 ± 2.6	30.9 ± 2.5	32.4 ± 4.4	33.9 ± 5.3	35.4 ± 2.8	27.6 ± 2.4	23.0 ± 2.8	28.1 ± 4.1	28.9 ± 5.2	29.5 ± 3.6	19.1 ± 2.6	
13	Мактраксантин	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.4 ± 0.6	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.5 ± 0.4	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.3	3.9 ± 0.4	5.5 ± 0.3	2.4 ± 0.2	
	Неидентифицированные	7.8	6.4	9.5	8.6	8.0	18.9	21.3	19.2	15.6	11.7	8.8	

Прочерк означает, что каротиноид не обнаружен.

Таблица 2. Динамика каротиноидов у моллюска *Anadara kagoshimensis* в период с февраля по июнь 2007 г.

Показатель		Динамика каротиноидов				
		Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
Суммарное содержание каротиноидов, мг*100 ⁻¹		4.6 ± 1.5	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.9	4.2 ± 1.3	4.8 ± 1.8
№	Название каротиноида	Доля каждого каротиноида в тканях <i>A. kagoshimensis</i> , (в %) от их суммы; февраль–июнь 2007 г.				
п/п						
1	β-каротин	–	4.5 ± 0.9	3.4 ± 0.5	3.1 ± 0.7	5.8 ± 1.5
2	Транс-пектенолон	22.3 ± 2.2	21.6 ± 1.7	22.1 ± 2.9	16.8 ± 1.6	18.3 ± 3.5
3	Цис-пектенолон	2.8 ± 1.1	2.7 ± 0.5	2.1 ± 0.6	2.4 ± 1.1	2.2 ± 0.7
4	Зеаксантин	3.1 ± 1.5	3.8 ± 1.2	2.3 ± 0.9	2.1 ± 0.5	2.6 ± 0.8
5	Аллоксантин	24.3 ± 2.2	19.2 ± 3.3	21.0 ± 4.1	19.3 ± 3.5	20.1 ± 3.2
6	Диатоксантин	10.2 ± 1.1	8.1 ± 2.5	8.2 ± 2.1	8.4 ± 1.8	8.5 ± 2.4
7	Пектенол А	–	5.7 ± 3.5	10.4 ± 2.8	6.3 ± 3.4	5.8 ± 2.7
8	Сумма эфиров каротиноидов	35.5 ± 4.5	31.3 ± 5.3	30.0 ± 7.3	39.2 ± 8.5	35.6 ± 6.5
	Неопределенные	1.8	3.1	0.5	2.4	1.1

отделам и классам Cyanophyta, Prochlorophyta, Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenophyta, Eustigmatophyta, Raphidophyceae, что делает его доступным в спектре питания круглый год, а колебания в концентрации могут быть вызваны вариациями численности видов микроводорослей, синтезирующих этот каротиноид и употребляемых моллюском. Диатоксантин, диатиноксантин, фукоксантин, являются характерными пигментами для диатомовых и многих динофитовых видов микроводорослей, встречаются также у представителей Prymnesiophyceae, Chrysophyceae и Raphidophyceae [24]. Лютеин и зеаксантин являются характерными для зеленых микроводорослей, однако источником зеаксантина может быть также и зоопланктон. Известно, что гетероксантин был открыт в 70-х годах прошлого столетия у желто-зеленых жгутиковых микроводорослей [25], которые синтезируют также диатиноксантин и диатоксантин. Однако высокая концентрация гетероксантина в течение всего года, несмотря на смену состава фитопланктона во время сезонных сукцессий, наводит на мысль о существовании дополнительного механизма метаболических преобразований в тканях *C. glaucum*. Ранее такой механизм преобразований был предложен для мидии *M. edulis* норвежскими учеными, которые считали, что предшественником может выступать диатиноксантин, у которого 5,6-эпокси-группа превращается в дополнительные две гидроксигруппы и образуется гетероксантин [26] (рис. 4). Исходя из структурного состава каротиноидов, неоксантин мог бы выступать предшественником образования диатиноксантина, в случае отсутствия или нехватки его в пищевом спектре моллюска.

В составе фитопланктона можно встретить микроводоросли, синтезирующие и аллоксантин

(Cryptophyta) [24, 27]. Их численность невелика, и это может быть причиной непостоянной концентрации этого ксантофилла в тканях моллюска. Сравнение годовой динамики каротиноидов у *C. glaucum* (табл. 1) и известных сезонных изменений фитопланктона и бентосных микроводорослей для Севастопольского побережья [22] позволяет предположить прямое влияние сезонных сукцессий на динамику большинства каротиноидов моллюска *C. glaucum*.

Мактраксантин – единственный каротиноид, не синтезируемый микроводорослями, его впервые обнаружили в составе моллюсков *Macra chinensis* в 1983 году [28]. Вероятным предшественником мактраксантина может быть широко распространенный у фотосинтезирующих организмов виолоксантин. Однако наличие такой трансформации у моллюсков пока не подтверждено.

Отличия в составе каротиноидов *C. glaucum* из черноморского региона и других ареалов обитания этого вида [8, 9] могут быть объяснены многими причинами. Климатические отличия регионов, гидрохимические отличия среды обитания влияют не только на пищевые цепи питания моллюсков. Под действием ряда внешних факторов моллюски могут приобретать изменения в наборе ферментов, что может привести к различной способности к усвоению тех или иных каротиноидов. Данная область является практически неисследованной. Существенной причиной отличия в литературных данных по составу каротиноидов для одного и того же вида моллюска мог стать прогресс в методах разделения и идентификации каротиноидов в 80–90-х годах прошлого столетия [19]. Совершенствование хроматографических и масс-спектрометрических методов послужило причиной для многих повторных исследований в области биохимии каротиноидов, что

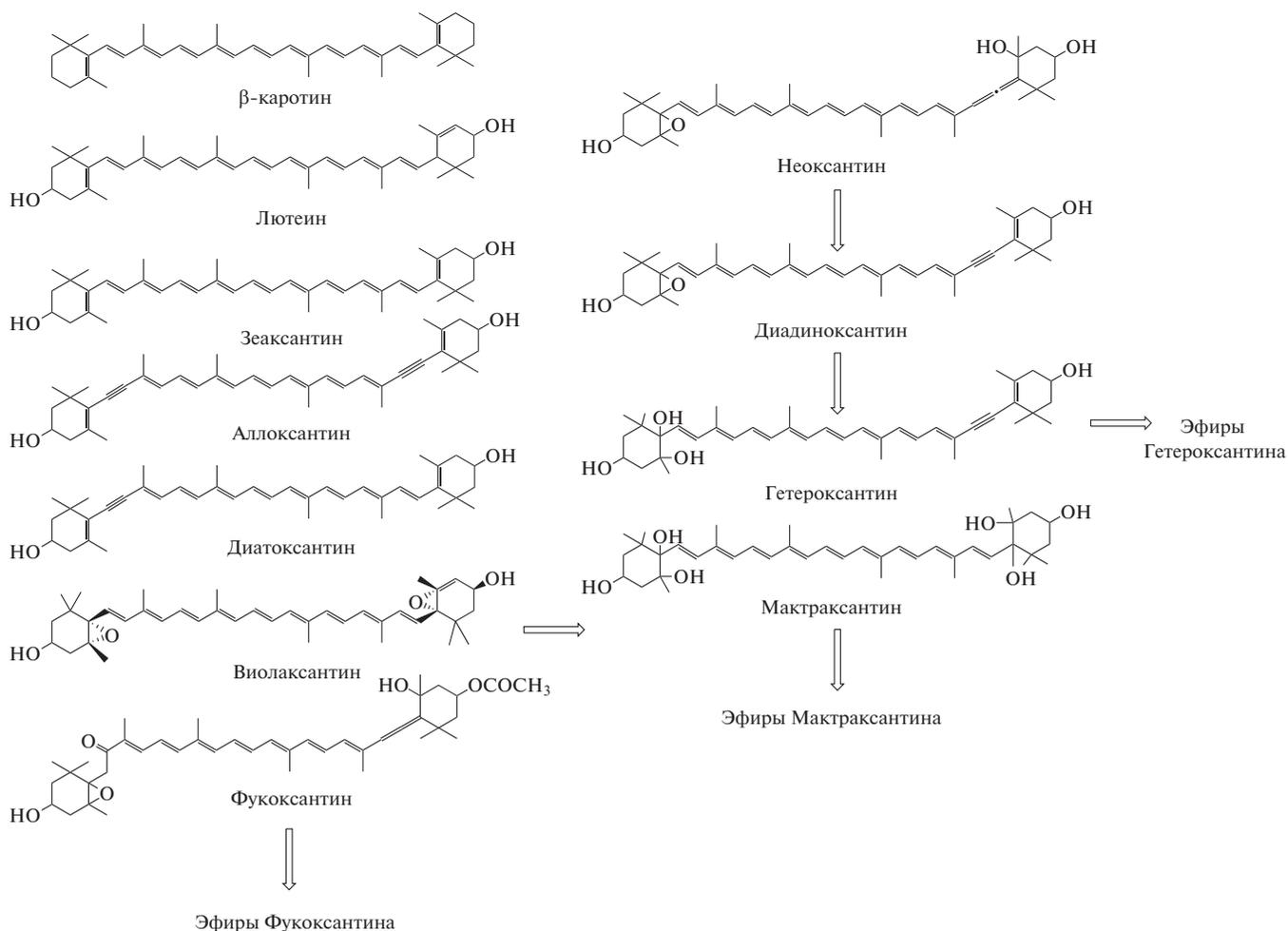


Рис. 4. Структурные формулы каротиноидов *C. glaucum*.

позволило открыть не только новые виды этих соединений, но и уточнить многие до конца неизученные механизмы их трансформации [1, 15].

Другой вид сестенофага – моллюск-вселенец в Черное море, *A. kagoshimensis*, несмотря на схожий образ жизни и спектр питания, накапливал всего 6 свободных (без учета изомеризации пектенолона) и 4 этерифицированных каротиноидов [20] (табл. 2). На протяжении трех сезонов наблюдалось лишь небольшое колебание фракций β-каротина и пектенола *A.* Изменение содержания последнего в летние месяцы может быть вызвано общей нагрузкой на организм в период нереста [20]. Представленные результаты показывают динамику фракций каротиноидов в организме анадарты в целом, чего не было показано в предыдущих опубликованных работах [15, 16, 20]. Это дает возможность для объективного сравнения состава каротиноидов *A. kagoshimensis* как с видовыми аналогами из других регионов Мирового океана, так и с другими видами. В отличие от *C. glaucum*, для *A. kagoshimensis* характерны более устойчивый качественный состав ка-

ротиноидов и менее выраженные сезонные изменения количества каротиноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Динамика суммарных каротиноидов в течение года у *Cerastoderma glaucum* связана, в первую очередь, с сезонными изменениями в спектре питания и репродуктивным циклом моллюска.

Качественный состав каротиноидов *C. glaucum* представлен 11-ю каротиноидами и 4-мя эфирами, большая их часть имеет растительное происхождение и накапливается без дальнейшего метаболического преобразования. Трансформация происходит с образованием мактраксантина и его эфиров, а также эфиров фукоксантина и гетероксантина. Самую высокую концентрацию в тканях моллюска имеет гетероксантин, причем на протяжении всего годового цикла, поэтому возможно наличие дополнительного преобразования для получения этого каротиноида: неоксантин → диадиноксантин → гетероксантин. Среди постоянных кароти-

ноидов, присутствующих независимо от годового цикла: β -каротин, гетероксантин и мактраксантин, а также эфиры последних двух каротиноидов, эта группа пигментов в течение года составляла 50–65% от суммы всех каротиноидов. Накопление всех остальных каротиноидов сильно зависит от спектра питания, который в свою очередь подвержен сезонным изменениям. Так, отмечено, что в более холодные периоды года в тканях *C. glaucum* накапливаются фукоксантин и его эфиры, характерные для диатомовых и ряда динофитовых видов микроводорослей, а в более теплые месяцы происходит снижение их концентрации (вплоть до исчезновения) и появление диадиноксантина, лютеина и зеаксантина, характерных более для теплолюбивых зеленых и желто-зеленых жгутиковых микроводорослей.

Несмотря на схожесть в образе жизни и спектре питания, другой моллюск-фильтратор, *A. kagoshimensis* не обладал столь очевидной и сильной зависимостью от сезонных изменений. В его тканях существуют следующие процессы трансформации растительных каротиноидов: диатоксантин \rightarrow пектенол А \rightarrow пектенолон (цис-; транс-), а сезонным колебаниям подвержены только содержания β -каротина и пектенола А.

Из сравнения результатов исследований обоих видов моллюсков можно отметить, что сезонным колебаниям каротиноидов в большей степени подвергаются моллюски с наиболее широким спектром накопления различных растительных каротиноидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме государственного задания ФГБУН ИМБИ РАН “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”. Рег. номер НИОКТР АААА-А 18-118021490093-4; дата рег. 14.02.2018 г. В работе использовали оборудование ЦКП “Дальневосточный центр структурных исследований” ИХ ДВО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.). Carotenoids. Vol. 3. Biosynthesis and Metabolism. Basel: Birkhäuser Verlag. 1998.
2. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.). Carotenoids. Vol. 4. Natural Functions. Basel: Birkhäuser Verlag. 2008.
3. Киселёва М.И., Ревков П.К., Копытов Ю.П. Современное состояние и многолетние изменения зообентоса Стрелецкой бухты (район Севастополя). Гидробиологический журнал. 33 (1): 3–13. 1997. [Kiseleva M.I., Revkov N.K., Kopytov Y.P. Modern State and Long-Term Changes in Zoobenthos of the Streletskaaya Bight (Sevastopol Region). Hydrobiological Journal. 33 (1): 3–13. 1997 (in Russ)].
4. Савикин А.И., Набоженко М.В. Распространение двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789) (Bivalvia: Cardiidae) в Таганрогском заливе Азовского моря. Вестник Южного науч. Центра РАН. 6 (4): 105–107. 2010. [Savikin A.I., Nabozhenko M.V. Distribution of bivalve mollusk *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789) (Bivalvia: Cardiidae) in Taganrog Bay of the Azov Sea. Vestnik Yuzhnogo nauch. Centra RAN. 6 (4): 105–107. 2010.]
5. Набоженко М.В. Реконструкция и динамика таксоценоза двустворчатых моллюсков (Mollusca: Bivalvia) Азовского моря в позднем галогене в связи с изменением солёности. Труды Зоологического института РАН. Прилож. 3: 182–191. 2013. [Nabozhenko M.V. Reconstruction and dynamics of bivalves taxocenoses (Mollusca: Bivalvia) of the sea of Azov in late holocene in connection with change of salinity. Proceedings of the Zoological Institute RAN. Prilozhenie 3: 182–191. 2013 (in Russ)].
6. Андреева С.И., Андреев Н.И. Эволюционные преобразования двустворчатых моллюсков Аральского моря в условиях экологического кризиса. Омск: Изд-во Омского государственного педагогического университета. 2003. [Andreeva S.I., Andreev N.I. Evolyucionnye preobrazovaniya dvustvorchatykh mollyuskov Aral'skogo morya v usloviyah ekologicheskogo krizisa. [Evolutionary transformations of bivalve mollusks of the Aral Sea in conditions of ecological crisis] Omsk: Izd-vo Omskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. 2003 (in Russ)].
7. Андреева С.И. Современные *Cerastoderma* (Bivalvia, Cardiidae) Аральского моря: Систематика, изменчивость, эволюция. Омск: Изд-во Омского государственного педагогического университета. 2000 [Andreeva S.I. Sovremennye *Cerastoderma* (Bivalvia, Cardiidae) Aral'skogo morya: Sistematika, izmenchivost', evolyuciya. [Modern *Cerastoderma* (Bivalvia, Cardiidae) of the Aral Sea: Systematics, variability, evolution]. Omsk: Izd-vo Omskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. 2000.]
8. Goodwin T.W. The biochemistry of the carotenoids: animals. London; New York: Chapman and Hall. 1984.
9. Boyden C.R. Comparative studies on *Cerastoderma edule* (L.) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret): PhD thesis. Department of Zoology & Comparative Physiology, Queen Mary College. London. 1970.
10. Stancher B., Zonta F., Favretto L.G. High-performance liquid chromatography of carotenoids from some marine shellfish. J. of Chromatography. 440: 37–46. 1988.

11. *Бородина А.В.* Особенности накопления каротиноидов некоторыми черноморскими моллюсками-фильтраторами *in vivo*. Материалы научных мероприятий, приуроч. к 15-летию Южного научного центра Российской академии наук, г. Ростов-на-Дону, 13–16 декабря, 2017 г. Ростов-н/Д. 351–353. 2017. [*Borodina A.V.* Osobennosti nakopleniya karotinoidov некотoryми chernomorskimi mollyuskami-filtratorami *in vivo*. Materialy nauchnyh meropriyatij, priuroch. k 15-letiyu Yuzhnogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk, g. Rostov-na-Donu, 13–16 dekabrya, 2017. [Features of carotenoid accumulation by some Black Sea filter-feeding bivalves *in vivo*. Materials of scientific events to the 15th anniversary of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, December 13–16, 2017] Rostov-n/D. 351–353. 2017 (in Russ)].
12. *Gostiukhina O.L., Golovina I.V.* Comparative Analysis of Antioxidant Complex of the Black Sea Mollusks *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara inaequalis* and *Crassostrea gigas*. Hydrobiological Journal. 49 (3): 77–84. 2013.
13. *Шульман Г.Е., Солдатов А.А. (ред.)* Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014 [*Shulman G.E., Soldatov A.A. (red.)* Chernomorskije mollyuski: elementy sravnitel'noj i ekologicheskoj biokhimii. [Black Sea mollusks: elements of comparative and ecological biochemistry]. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. 2014 (in Russ)].
14. *Гостюхина О.Л., Андреев Т.И.* Ферментное и низкомолекулярное звено антиоксидантного комплекса двух видов черноморских моллюсков с разной устойчивостью к окислительному стрессу: *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Журнал общей биологии. 79 (6): 482–492. 2018. [*Gostyukhina O.L., Andreenko T.I.* Enzymatic and low-molecular weight units of antioxidant complex in two species of the Black Sea mollusks with different resistance to oxidative stress: *Mytilus galloprovincialis* Lam. and *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Zhurnal obshchej biologii. 79 (6): 482–492. 2018 (in Russ)].
15. *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. Evol. Biochem. Physiol. 53 (4): 289–297. 2017.
16. *Бородина А.В. Солдатов А.А.* Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков. С. 87–168. в кн. Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. Шульман Г.Е., Солдатов А.А. (ред.) Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014. [*Borodina A.V. Soldatov A.A.* Karotinoidy tkanej massovyh vidov chernomorskih mollyuskov. S. 87–168. v kn. Chernomorskije mollyuski: elementy sravnitel'noj i ekologicheskoj biokhimii. Shulman G.E., Soldatov A.A. (red.) [Carotenoids of tissues of dominant species of Black Sea shellfish. p. 87–168. In book Black Sea clams: elements of comparative and ecological biochemistry. Shulman G.E., Soldatov A.A. (Eds.)]. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. 2014 (in Russ)].
17. *Borodina A.V., Soldatov A.A.* The Qualitative Composition of Carotenoids and Their Seasonal Dynamics in Tissues of the Bivalve *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Rus. J. of Marine Biology. 42 (2): 166–178. 2016.
18. *Маока Т., Акимото Н.* Natural product chemistry in carotenoid some experimental techniques for structural elucidation and analysis of natural carotenoids. Carotenoid Science (Mini-review). 13: 10–17. 2008.
19. *Карнаухов В.Н.* Биологические функции каротиноидов. М.: Наука. 1988. [*Karnaukhov V.N.* Biologicheskie funkcii karotinoidov [Biological functions of carotenoids]. M.: Nauka. 1988 (in Russ)].
20. *Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.)*. Carotenoids. Vol. 1 A. Isolation and Analysis. Basel: Birkhäuser Verlag. 1995.
21. *Borodina A.V.* Carotenoids in the Gonads of the Bivalved Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). J. Evol. Biochem. Physiol. 54 (4): 267–272. 2018.
22. *Токарев Ю.Н., Финенко З.З., Шадрин Н.В. (ред.)* Микроводоросли Черного моря: проблемы биоразнообразия, сохранения и биотехнологического использования. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2008. [*Tokarev Yu.N., Finenko Z.Z., Shadrin N.V. (red.)* Mikrovodorosli Chyornogo morya: problemy bioraznobraziya, sohraneniya i biotekhnologicheskogo ispol'zovaniya [Black Sea microalgae: biodiversity, conservation and biotechnology use issues]. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. 2008 (in Russ)].
23. *Михайлова Т.В.* Особенности размножения *Cerastoderma glaucum* (Mollusca, Bivalvia) в Черном море. Экология моря. 23: 64–68. 1986. [*Mikhailova T.V.* Osobennosti razmnozheniya *Cerastoderma glaucum* (Mollusca, Bivalvia) v Chyornom more [Features of the reproduction of *Cerastoderma glaucum* (Mollusca, Bivalvia) in the Black Sea]. Ekologiya morya. 23: 64–68. 1986 (in Russ)].
24. *Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Bjørnland T.* Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. Paris. 1997.
25. *Strain H.H., Svec W.A., Katz J.J.* Structure of heteroxanthin, a unique xanthophyll from the Xanthophyceae (Heterokontae). J. of the Chemical Society D Chemical Communications. 876–877. 1970.
26. *Partali V., Tangen K., Liaaen-Jensen S.* Carotenoids in food chain studies – III. Resorption and metabolic transformation of carotenoids in *Mytilus edulis* (Edible mussel). Comp. Biochem. Physiol. 92B (2): 239–246. 1989.
27. *Takaichi S.* Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. Mar. Drugs. 9: 1101–1118. 2011.
28. *Matsuno T., Sakaguchi S.* A novel marine carotenoid, mactraxanthin from the Japanese Edible Surf clam. Tetrahedron Letters. 24 (9): 911–912. 1983.

**A Comparative Annual Dynamics of Carotenoids in Tissues
of Bivalve Mollusks *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789)
and *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906)**

A. V. Borodina^{a,#} and P. A. Zadorozhny^b

^a *A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia*

^b *Institute of Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia*

[#]*e-mail: borodinaav@mail.ru*

The annual dynamics of carotenoids was explored in the bivalve mollusk *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) and compared to that in another bivalve species, *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), both inhabiting the Black Sea's Cossack Bay. The carotenoid spectrum was found to be represented by 11 free and 4 esterified forms. Out of them, β -carotene, heteroxanthin and mactraxanthin, as well as the esters of the latter two carotenoids, were present all the year through and accounted for 50–60% of total carotenoids, with mactraxanthin being species-specific. The other (minor) carotenoid fractions were present inconstantly being subject to seasonal fluctuations. Despite similar feeding types and habitats, the repertoire and patterns of seasonal changes in carotenoid levels in *C. glaucum* and *A. kagoshimensis* were established to be considerably different. Distinctions were also revealed in the carotenoid spectrum of *C. glaucum* compared to *Cerastoderma* species from other habitats.

Keywords: seasonal carotenoid dynamics, bivalve mollusks, *Cerastoderma glaucum*, *Anadara kagoshimensis*, mactraxanthin, carotenoid transformation, Black Sea