

СОДЕРЖАНИЕ КАРОТИНОИДОВ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА В ТКАНЯХ ЭВРИБИОНТНОГО ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *CERASTODERMA GLAUCUM* (BRUGUIÈRE, 1789) (BIVALVIA:CARDIIDAE)

© 2020 г. О. Л. Гостюхина^{1,*}, А. В. Бородина^{1,**}

¹ ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”, Севастополь, Россия

*e-mail: gostolga@yandex.ru

**e-mail: borodinaav@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2019 г.

После доработки 07.11.2019 г.

Принята к публикации 20.11.2019 г.

Впервые исследовали взаимосвязь между содержанием каротиноидов и состоянием антиоксидантного (АО) комплекса в тканях эврибионтного черноморского двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789) из естественных местообитаний, имеющего высокую устойчивость к окислительному стрессу. В гепатопанкреасе, жабрах и ноге моллюска определяли активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), СОД и каталазы, а также уровень восстановленного глутатиона (GSH) и ТБК-активных продуктов. Прямая корреляционная связь установлена между суммарным содержанием каротиноидов и глутатионовой системой — уровнем GSH ($R^2 = 0.98$) и активностью глутатионпероксидазы ($R^2 = 0.84$). Это отражает возможное синергическое взаимодействие между этими системами в АО реакциях. Обратная зависимость выявлена между уровнем каротиноидов и активностью супероксиддисмутазы и каталазы ($R^2 = 0.97$ и 0.98), что связано с возможными конкурентными отношениями этих систем. Установленные зависимости отражают особенности взаимосвязи каротиноидов и АО комплекса и их роль в адаптациях *C. glaucum* к окислительному стрессу, а также могут явиться основой дальнейших исследований для получения из тканей моллюсков биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: каротиноиды, антиоксидантный комплекс, двустворчатые моллюски, окислительный стресс, адаптация, биологически активные вещества

DOI: 10.31857/S0044452920020060

ВВЕДЕНИЕ

Морские двустворчатые моллюски — одни из самых широко изучаемых гидробионтов вследствие их важной экологической роли в донных и пелагических биоценозах, а также экономического значения для разведения в марихозяйствах [1–8]. Эти животные отличаются, с одной стороны, высокоэффективным АО комплексом [3, 8–10], с другой — богатым составом и высоким содержанием каротиноидов, наряду с АО комплексом осуществляющих¹ защитную АО функцию и участвующих во

многих адаптационных процессах в организме [4, 6, 7, 11–14]. Высокая устойчивость морских двустворок к неблагоприятным факторам среды вызывает активный интерес исследователей [5–10, 14–16], в том числе и в связи с возможностью получения из их тканей ряда биологически активных веществ (БАВ), которые могут служить важным сырьем в медицине, фармакологии, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и других отраслях. БАВ из тканей моллюсков могут стать основой для получения лечебных, лечебно-профилактических препаратов, БАД к пище человека и кормам домашних животных, натуральных консервантов для продуктов питания и т.п. [1, 4, 13, 17, 18].

АО комплексу двустворчатых моллюсков посвящены многочисленные исследования. Так, для многих моллюсков установлено наличие высоких показателей АО системы, отражающих ее высокую эффективность, как в естественных условиях обитания [8, 10, 19–21], так и при действии гипоксии, аноксии/реоксигенации [5, 22–24], многочислен-

¹ Сокращения: АО — антиоксидантный; АГС — антиоксидантная глутатионовая система; АФК — активные формы кислорода; GSH — глутатион восстановленный; GSSG — глутатион окисленный; ГП — глутатионпероксидаза; ГР — глутатионредуктаза; МДА — малоновый диальдегид; ОС — окислительный стресс; ПОЛ — перекисное окисление липидов; СРО — свободно-радикальное окисление; СОД — супероксиддисмутаза; СОАР — супероксидный анион-радикал; ССК — суммарное содержание каротиноидов; ТБК-активные продукты — продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.

ных поллютантов [3, 9, 15, 16, 19]. Высокая активность АО ферментов установлена и у двустворок с более высокой устойчивостью к окислительному стрессу по сравнению с менее устойчивыми моллюсками: у анадары в сравнении с мидией, у мидии — по отношению к гребешку, у других видов двустворок [8, 20, 21, 25], а также при сравнении двустворчатых моллюсков с другими бентосными животными, например, полихетами [15, 16].

Экстракты из морских гидробионтов обладают АО свойствами, в том числе и благодаря наличию в них каротиноидов [1, 4, 17, 18]. Наряду с АО свойствами известен и ряд других важных биологических свойств каротиноидов, в том числе и из морских моллюсков: противоопухолевые, иммуномодулирующие, антиканцерогенные, антимуtagenные, антиоксидантные [1, 4, 12, 26]. Предполагают, что эти пигменты принимают участие в регуляции клеточного метаболизма, текучести мембран, процессов роста [4, 13, 26].

Среди двустворчатых моллюсков одними из наиболее устойчивых к действию неблагоприятных факторов водной среды считают моллюсков рода *Cerastoderma* — эврибионтных, массово распространенных в Мировом океане, имеющих большую численность популяций и играющих важную роль в структуре и функционировании донных морских биоценозов [2, 15, 16, 22].

Моллюски *Cerastoderma sp.* адаптировались к широкому диапазону факторов внешней среды — гипоксии, температуре от 0 до 25°C, солености 5–38‰ [2, 22]. Сердцевидки обитают в водоемах с высокой степенью загрязнения донных осадков, превосходят ряд других бентосных животных по устойчивости к загрязнению, что во многом обусловлено эффективностью АО комплекса этих моллюсков [15, 16].

Как показано нами ранее, в тканях двустворчатых моллюсков существует взаимосвязь между содержанием каротиноидов и АО комплексом. Выявлена корреляционная связь суммарного содержания каротиноидов, а также их отдельных видов, с показателями АО комплекса и перекисного окисления липидов (ПОЛ) (ферментами, глутатионом, ТБК-активными продуктами) в тканях моллюска *Anadara kagoshimensis* — одного из наиболее устойчивых к окислительному стрессу морских организмов. Показано, что взаимосвязь между этими молекулярными системами может иметь двойственный характер — как синергический (между ССК и глутатионовой системой), так и антагонистический (между ССК и системой СОД-каталаза), так как в ряде случаев каротиноиды, вероятно, могут иметь конкурентные отношения с компонентами АО системы за субстраты [6, 7, 14]. Поэтому наше внимание привлекли следующие аспекты:

— необходимо выяснить, характерна ли взаимосвязь между уровнем каротиноидов и АО системой

для других двустворок с высокой устойчивостью к ОС, помимо анадары;

— характер взаимодействия ССК с компонентами АОС (синергический или антагонистический) отражает те приспособительные возможности, которые, наряду с другими свойствами, и определяют высокую устойчивость многих двустворок к ОС в водной среде. Такое функциональное биоразнообразие позволяет этим организмам осуществлять тонкую регуляцию АО-прооксидантного равновесия в тканях и гибко адаптироваться к постоянным изменениям в окружающей среде; тем более, что АО система и ПОЛ — универсальные неспецифические системы, с помощью которых реализуется любое стрессорное воздействие на организм;

— как и в случае с анадарой, настоящее исследование открывает перспективу дальнейшего изучения взаимосвязи между АО системой и отдельными видами каротиноидов, многие из которых обладают своей спецификой АО действия, следовательно, будут иметь и специфический характер взаимодействия с АО комплексом.

В этой связи представляет интерес исследовать взаимосвязь между АО системой и комплексом каротиноидов в тканях сердцевидки *C. glaucum* — моллюска с высокой устойчивостью к окислительному стрессу. Выявление особенностей взаимодействия этих молекулярных систем может способствовать пониманию механизмов устойчивости моллюсков к условиям их обитания, а также позволяет получить представление о сердцевидке *C. glaucum* как о потенциальном источнике БАВ с АО свойствами, которые могут найти применение в медицине, фармакологии и сельском хозяйстве.

Такие подходы и определили цель настоящей работы — установить наличие и характер взаимосвязи между суммарным содержанием каротиноидов и основными показателями АО комплекса и ПОЛ в тканях двустворчатого моллюска *C. glaucum*, обладающего высокой устойчивостью к окислительному стрессу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования — двустворчатый моллюск-фильтратор сердцевидка зеленая *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789), собранный в условно чистой акватории — бухте Казачья (район Севастополя, Черное море). Пробы отбирали в мае 2018 г. при температуре воды 17–18°C. Длина раковины составляла 21.1–25.5 мм, вес животных — 3.9–7.2 г. (табл. 1). Моллюсков доставляли в лабораторию в течение 30 мин после сбора для препарирования тканей. У животных извлекали гепатопанкреас, жабры и ногу, определяли сырой вес тканей, затем хранили при температуре –80°C для определения активности АО ферментов.

Определение суммарного содержания каротиноидов. Образцы тканей, которые были только что извлечены, гомогенизировали в фарфоровой ступке с кварцевым стеклом при соблюдении мер предосторожности, рекомендуемых при работе с пигментами [27]. Экстракцию пигментов проводили в темноте при 15–20°C, используя 90% ацетон в соотношении 1 часть тканей: 5 частей растворителя. Обработанные таким образом пробы хранили в течение суток в холодильнике при –20°C. После охлаждения суспензии центрифугировали при 1500 об./мин на лабораторной центрифуге ОПН-3 в течение 10–15 мин. Полученные растворы фильтровали для удаления остатков тканей.

ССК определяли в ацетоновых экстрактах по методу В.Н. Карнаухова [28]. В работе применяли однолучевой спектрофотометр СФ-2000 (Россия). Расчеты проводили по следующему уравнению:

$$C_{\text{кар}} = (0.4E_p V)/m,$$

где $E_p = E_{450} - 2.25E_{670}$; E_{450} , E_{670} — величины экстинкций при 450 и 670 нм; V — объем ацетонового экстракта, мл; m — масса ткани, г; $C_{\text{кар}}$ — концентрация каротиноидов в мг на 100 г сырого веса ткани.

Определение параметров АО комплекса и ПОЛ. При работе с ферментами все действия производили с использованием ледяной бани при температуре 0–4°C. Ткани гомогенизировали с использованием холодного фосфатного буфера (50 мМ, pH 7.4). Буфер готовили на основе 50 мМ растворов Na_2HPO_4 и KH_2PO_4 . Затем с помощью pH-метра был приготовлен раствор со значением pH 7.4.

Супернатанты получали путем центрифугирования гомогенатов при 3200 g в течение 15 мин с помощью рефрижераторной центрифуги К-23D (Германия) и использовали для определения показателей немедленно.

Определяли активность следующих ферментов: глутатионпероксидазы (ГП) (НФ 1.11.1.9) — по содержанию окисленного глутатиона (GSSG) при длине волны 260 нм, глутатионредуктазы (ГР) (НФ 1.8.1.7) — по убыли НАДФН при длине волны 340 нм [29], супероксиддисмутаза (СОД) (НФ 1.15.1.1) — по степени ингибирования восстановления нитро-синего тетразолия в присутствии НАДН и феназинметасульфата при длине волны 540 нм [30]. Активность каталазы (НФ 1.11.1.6) оценивали по реакции пероксида водорода с молибдатом аммония, экстинкцию измеряли при длине волны 410 нм [31]. При определении активности ферментов поддерживали температуру инкубационной среды на уровне $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Активность ГП выражали в мкмоль GSSG в минуту на 1 мг белка, ГР — в мкмоль НАДФН в минуту на 1 мг белка, СОД — в мкмоль НАДН в минуту на 1 мг белка, каталазы — в мкмоль пероксида водорода в минуту на

Таблица 1. Массово-размерные характеристики моллюсков *Cerastoderma glaucum*

Table 1. Weight-dimensional characteristics of clams *Cerastoderma glaucum*

№	<i>L</i> , мм	<i>B</i> , мм	<i>H</i> , мм	<i>M</i> , г
1	23.5	27.1	18.5	6.2
2	24.5	29.0	18.6	6.9
3	21.1	25.4	17.4	4.4
4	23.5	27.2	18.5	6.2
5	25.3	29.5	19.5	7.2
6	24.5	28.3	18.2	6.8
7	23.5	27.3	19.3	6.2
8	25.5	29.0	19.5	7.2
9	24.0	25.1	27.1	6.5
10	23.2	25.5	17.8	5.8
11	22.1	25.6	17.9	5.1
12	24.4	26.1	18.3	6.1
13	22.5	24.3	18.5	4.5
14	24.0	25.4	19.9	6.0
15	21.3	23.8	16.5	3.9
16	24.5	28.0	18.4	7.1
17	24.6	31.1	21.0	6.9

Примечание: *L* — длина раковины, *B* — ширина, *H* — высота, *M* — масса моллюска.

Notes: *L* — shell length, *B* — width, *H* — height, *M* — weight of shell-fish.

1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Содержание восстановленного глутатиона (GSH) определяли в гомогенатах, которые готовили отдельно, используя 5% метафосфорную кислоту. Проводили реакцию с аллоксановым реактивом [32]. Концентрацию GSH выражали в мкг на 1 г ткани. Количество продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов). Измерения экстинкции продукта реакции проводили при длине волны 532 нм и выражали в мкмоль малонового диальдегида (МДА) на 1 г ткани [33].

Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Статистическая обработка, корреляционный анализ и графическое оформление результатов проводились при помощи пакетов программ “Grapher-7” и Past 3. Количество особей в выборке составляло от 14 до 17. Результаты представлены как среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднего. Каждой точке на рисунках соответствует среднее значение. Для оценки достоверности различий рассчитывали *U*-критерий Ман-

Таблица 2. Суммарное содержание каротиноидов и показатели антиоксидантного комплекса и ПОЛ в тканях двусторчатого моллюска *C. glaucum***Table 2.** Total carotenoid amount, antioxidant complex and lipid peroxidation values in *C. glaucum* bivalve clam tissues

Показатели	Виды тканей/Types of tissues		
	гепатопанкреас/ hepatopancreas	жабры/ branchiaes	нога/ toe
Суммарное содержание каротиноидов, мг/100 г ткани/Total carotenoid amount, mg/100g tissue	6.28 ± 0.3	0.1 ± 0.01***	1.85 ± 0.2
Содержание глутатиона, мкг/г ткани/Glutathione amount, µg/g tissue	178.3 ± 29.5	56.5 ± 3.1**	147.7 ± 20.7
Активность ГП, мкмоль GSSG/мин/мг белка/GP activity, µmol GSSG/min/mg of protein	59.1 ± 8.2	24.8 ± 4.8*	19.2 ± 1.07
Активность ГР, мкмоль НАДФН/мин/мг белка/Glutathione reductase activity, µmol NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) /min/mg of protein	527.6 ± 88.3	1642.2 ± 283.5***	280.2 ± 49.7
Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ /мин/мг белка/Catalase activity, µmol H ₂ O ₂ / min/mg of protein	13.5 ± 1.3	37.8 ± 6.7*/**	24.8 ± 1.7
Активность СОД, мкмоль НАДН/мин/мг белка/Superoxide dismutase(SOD) activity, µmol NADH/min/mg of protein	3959.7 ± 927.5	14362.4 ± 2951.3*/**	8224.3 ± 1973.8
Содержание ТБК-активных продуктов, мкмоль МДА/г ткани/TBA active product, µmol MDA/g tissue	24.2 ± 4.9	27.3 ± 7.2	21.5 ± 4.3

Отличия достоверны по сравнению с другими тканями/Differences are reliable compared to other tissues: * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$.

на–Уитни. Различия считали статистически достоверными при значении $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Суммарное содержание каротиноидов и уровень показателей АО комплекса и ПОЛ. ССК было наибольшим в гепатопанкреасе сердцевики, что в 3.4 раза выше, чем в ноге, и в 63 раза больше, чем в жабрах. Нога занимала промежуточное положение по величине данного показателя, что было в 18.5 раза больше по сравнению с жабрами. Различия между значением этого показателя во всех исследованных тканях были достоверны ($p \leq 0.05$ –0.001) (табл. 2).

Наиболее высокая активность ГП и уровень GSH зафиксированы в гепатопанкреасе сердцевики. Активность фермента была в 2.4–3.1 раза выше ($p \leq 0.05$ –0.01), чем в жабрах и ноге, а уровень GSH – в 3.1 раза больше ($p \leq 0.01$), чем в жабрах, но близок к значению в ноге моллюска. Напротив, ГР проявила наибольшую активность в жабрах – в 3.1–5.9 раза выше ($p \leq 0.001$) по сравнению с остальными тканями (табл. 2).

В отличие от большинства показателей антиоксидантной глутатионовой системы (АГС), самая высокая активность каталазы и СОД отмечена в жабрах сердцевики. Активность каталазы была выше, чем в гепатопанкреасе и ноге, в 1.5–2.8 раза ($p \leq 0.05$ –0.01), а СОД – в 1.7–3.6 раза ($p \leq 0.05$ –0.01) (табл. 2). В содержании ТБК-активных про-

дуктов тканевых отличий обнаружено не было (табл. 2).

Корреляционный анализ. Анализ корреляционных связей между показателями АО комплекса и содержанием каротиноидов в тканях сердцевики позволил установить наличие и характер взаимодействия между этими молекулярными системами. Обращает на себя внимание противоположный характер взаимосвязи между ССК и АО системами, имеющими свою специфику АО действия, – антиоксидантной глутатионовой системой (АГС) и ключевыми АО ферментами СОД и каталаза:

– с компонентами АГС (ГП и GSH), инактивирующими относительно низкие концентрации АФК и гидроперекисей, – прямая зависимость, $R^2 = 0.84$ (каротиноиды–ГП) и $R^2 = 0.98$ (каротиноиды–GSH) (рис. 1а, 1б); исключение составила ГР – с ее активностью выраженной зависимости не установлено ($R^2 = 0.35$) (рис. 1в);

– с системой СОД-каталаза, обезвреживающей супероксидный анион-радикал (СОАР) и H₂O₂ в высоких концентрациях, – обратная взаимосвязь, $R^2 = 0.97$ (каротиноиды–СОД) и $R^2 = 0.98$ (каротиноиды-каталаза) (рис. 2а, 2б).

На этом фоне между уровнем каротиноидов и содержанием ТБК-активных продуктов корреляционной связи не выявлено ($R^2 = 0.14$) (рис. 2в).

Анализ корреляционных связей между показателями самого АО комплекса выявил следующее. Между активностью ряда ферментов – СОД, ката-

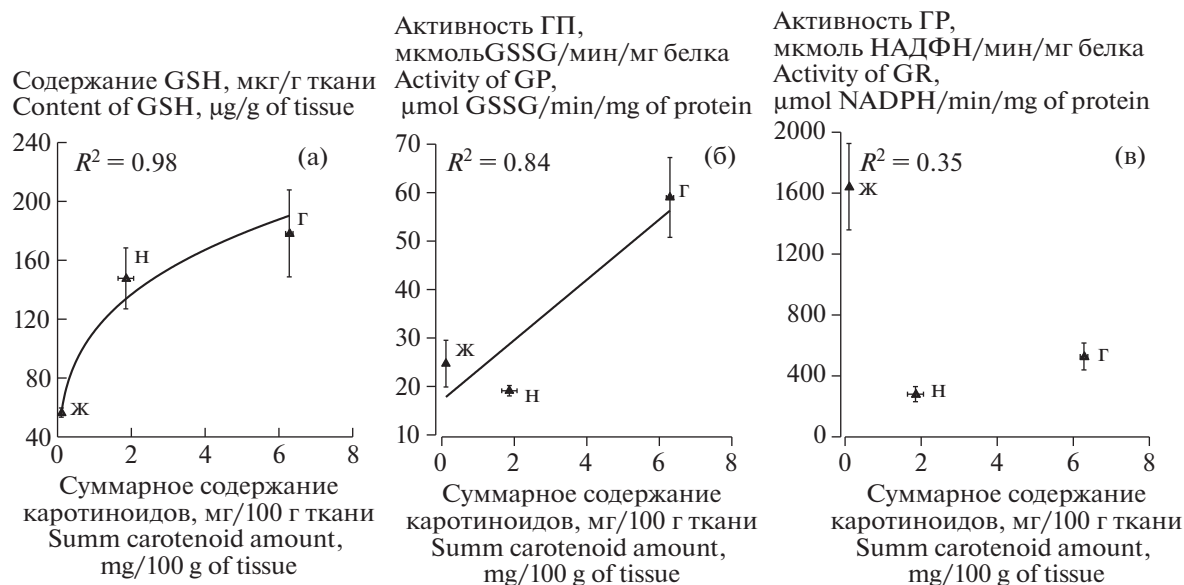


Рис. 1. Взаимосвязь между суммарным содержанием каротиноидов и уровнем глутатиона (GSH) (а), активностью глутатионпероксидазы (ГП) (б) и активностью глутатионредуктазы (ГР) (в) в тканях сердцевики *C. glaucum* (г – гепатопанкреас, ж – жабры, н – нога).

Fig. 1. Relationship between total carotenoid amount and glutathione level (GSH) (a), glutathione peroxidase (GP) activity (b) and glutathione reductase (GR) activity (c) in *C. glaucum* tissues (г – hepatopancreas, ж – gills, н – toe).

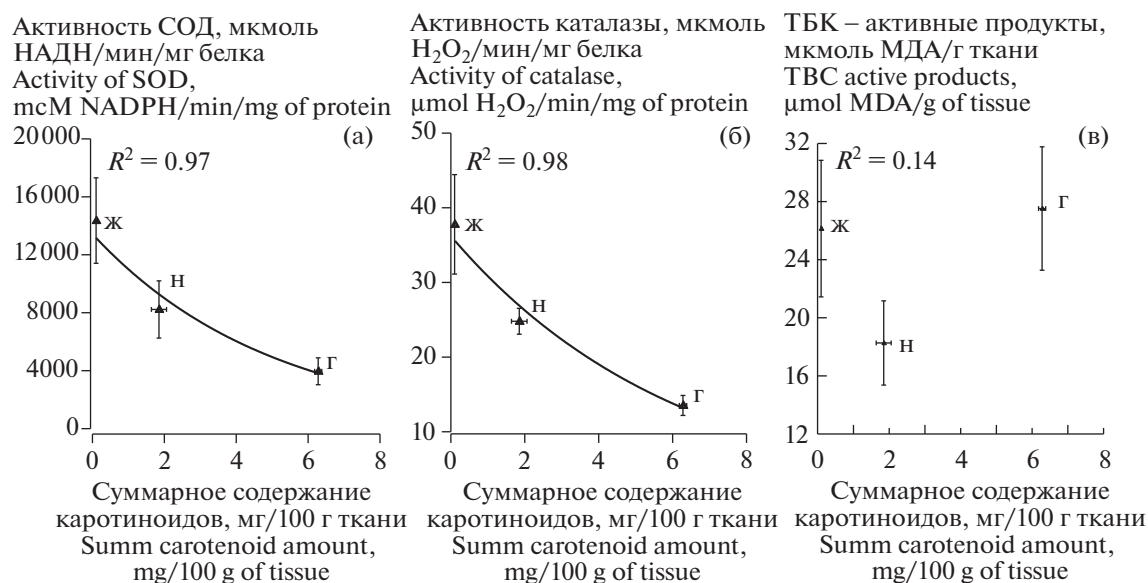


Рис. 2. Взаимосвязь между суммарным содержанием каротиноидов и активностью СОД (а), активностью каталазы (б) и уровнем ТБК-активных продуктов (в) в тканях сердцевики *C. glaucum* (г – гепатопанкреас, ж – жабры, н – нога).

Fig. 2. Relationship between total carotenoid content and ODS activity (a), catalase activity (b) and the level of TBC active products (c) in *C. glaucum* tissues (г – hepatopancreas, ж – gills, н – toe).

лазы и ГР, с одной стороны, и уровнем GSH – с другой, установлена обратная взаимосвязь: $R^2 = 0.97, 0.94$ и 0.84 соответственно (рис. 3а–3в). В то же время между активностью ГП и содержанием GSH корреляционная связь слабая, на уровне тенденции ($R^2 = 0.35$) (рис. 4а). Напротив, между

активностью СОД и каталазы обнаружена прямая зависимость со значением R^2 , близким к 1 ($R^2 = 0.996$) (рис. 4б).

Отсутствие выраженной зависимости между ССК и уровнем ТБК-активных продуктов, вероятно, связано с двойственным характером участия

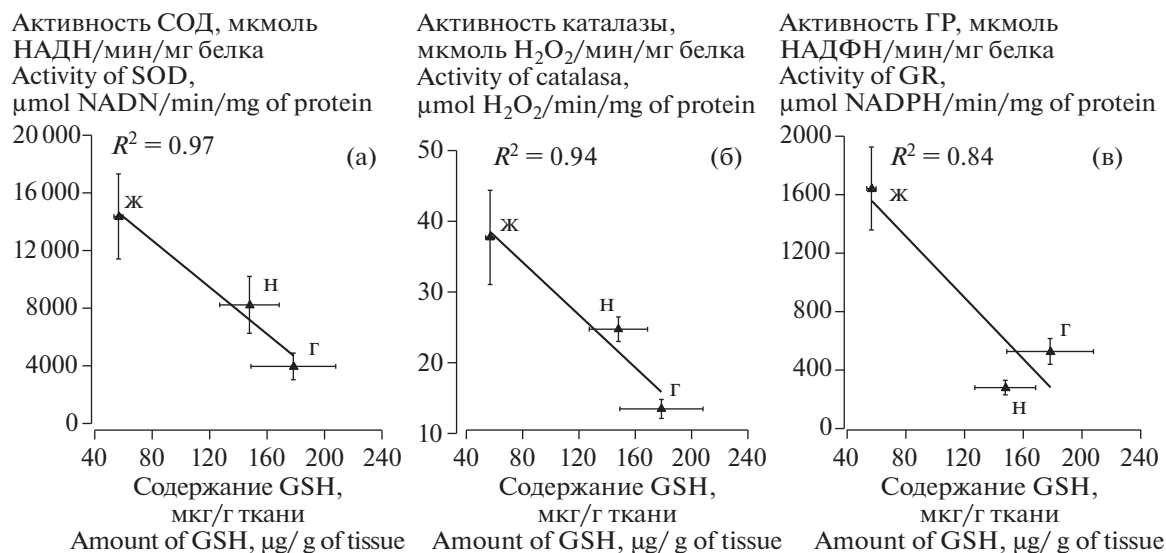


Рис. 3. Взаимосвязь между уровнем глутатиона (GSH) и активностью СОД (а), каталазы (б) и глутатионредуктазы (ГР) (в) в тканях сердцевики *C. glaucum* (г – гепатопанкреас, ж – жабры, н – нога).
Fig. 3. Relationship between glutathione (GSH) level and activity of SOD(a), catalase (b) and glutathione reductase (GR) (c) in *C. glaucum* tissues (г – hepatopancreas, ж – gills, н – toe).

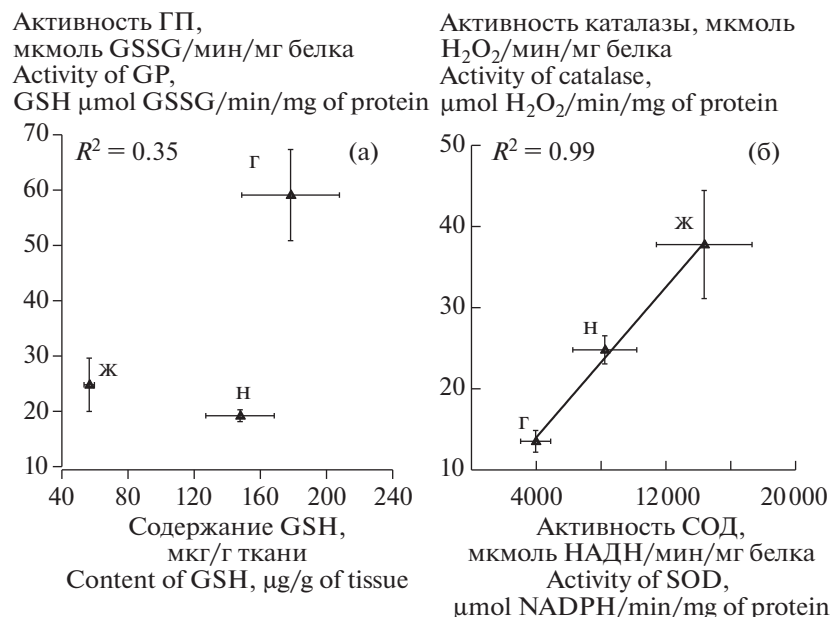


Рис. 4. Взаимосвязь между активностью глутатионпероксидазы (ГП) и содержанием глутатиона (GSH) (а), между активностью СОД и каталазы (б) в тканях сердцевики *C. glaucum* (г – гепатопанкреас, ж – жабры, н – нога).
Fig. 4. Relationship between glutathione peroxidase (GP) and glutathione (GSH) (a) level and activity of SOD and catalase (b) in *C. glaucum* tissues. (г – hepatopancreas, ж – gills, н – toe).

каротиноидов в АО-проокислительных процессах в организме. Известно, что в более низких концентрациях каротиноиды имеют АО свойства, а в более высоких – проокислительное действие, способствуя образованию и/или усилению генерации ряда активных форм кислорода (АФК) в клетке [26, 34]. Возможно, в силу указанной двойной роли каротинои-

дов определенная зависимость между их содержанием и уровнем продуктов ПОЛ не выявлена.

Взаимодействие каротиноидов и АГС. Как известно, каротиноиды способны обезвреживать ряд АФК: супероксидный анион-радикал ($\text{CO}_2^{\cdot-}$), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), гидроксильный ради-

кал ($\text{OH}^\bullet$), а также гидроперекиси липидов и жирных кислот [34–38]. В свою очередь глутатион и ГП способны обезвреживать те же виды АФК, что и каротиноиды [35, 37, 39]. Учитывая общность субстратов, инактивируемых ГП, GSH и каротиноидами, а также установленную нами положительную взаимосвязь между ними, можно предположить, что эти соединения выполняют совместную АО функцию в отношении гидроперекисей жирных кислот и указанных АФК. Однако в силу разного сродства к субстратам их АО действие носит, вероятно, взаимодополняющий сочетанный характер. Предполагаем, что это дает клеткам возможность задействовать разные пути инактивации АФК и продуктов ПОЛ в зависимости от их концентрации, прооксидантно-антиоксидантного баланса, общего состояния организма, других факторов.

Другой механизм АО действия каротиноидов связан с улавливанием свободных радикалов, что отличает эти пигменты от некоторых других специализированных антиоксидантов, например, витамина Е, который непосредственно участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Различия в механизмах АО действия таких антиоксидантов и обуславливают их синергизм [26]. Это позволяет предположить возможность подобного синергизма и в системе каротиноиды–АГС. Являясь специализированными антиоксидантами, ГП и GSH напрямую вступают в реакции с АФК и перекисными радикалами [35, 39]. На этом фоне каротиноиды способны быть “ловушками” свободных радикалов, подвергаясь при этом автоокислению с образованием ряда производных [26, 34]. Следовательно, в силу разных механизмов, АГС (ГП, GSH) и каротиноиды, возможно, осуществляют свое АО действие совместно в отношении одних и тех же видов АФК. Вероятно, каротиноиды и АГС функционируют как система синергистов, инактивирующих пероксид водорода, гидроперекиси липидов и такие АФК, как СОАР, $^1\text{O}_2$, $\text{OH}^\bullet$.

Кроме того, синергическую взаимосвязь между каротиноидами и АГС можно подтвердить и другими АО свойствами каротиноидов. В частности, показана способность этих соединений к потенцированию функции низкомолекулярных антиоксидантов, включая GSH, а также к повышению активности GSH-зависимых ферментов – ГП, ГР и ГТ [26]. Установленная нами отрицательная связь между ГР и GSH у сердцевидки ($R^2 = 0.84$) может служить косвенным подтверждением совместной АО функции каротиноидов и GSH, так как именно в тканях с высоким уровнем GSH и каротиноидов активность ГР – более низкая (гепатопанкреас, нога). Напротив, на фоне наименьшего содержания GSH и каротиноидов в жабрах сердцевидки активность ГР – максимальная из всех тканей. Возможно, это связано с необходимостью дополнительной

защиты жабр сердцевидки, испытывающих более высокую окислительную нагрузку по сравнению с другими тканями животного как орган дыхания и фильтрации. Более того, жабры двустворчатых моллюсков рассматривают как глутатион-зависимый барьер между организмом моллюска и водной средой [42], что дополнительно подчеркивает важность синергического взаимодействия GSH и каротиноидов, обеспечивающих комплексную АО защиту жабр моллюска.

Взаимодействие каротиноидов и системы СОД-каталаза. Как показали полученные результаты, между активностью СОД и каталазы, с одной стороны, и уровнем каротиноидов – с другой, установлена обратная связь. В гепатопанкреасе и ноге с более высоким уровнем каротиноидов активность СОД и каталазы была меньше, чем в жабрах. Жабры сердцевидки, напротив, отличались существенно более активными СОД и каталазой на фоне наименьшего содержания каротиноидов. Эти особенности подчеркивают отличия во взаимодействии каротиноидов с АО комплексом в разных по метаболизму тканях моллюска, а также тканевую специфику АО защиты сердцевидки в целом.

Возможны следующие варианты взаимодействия каротиноидов с ферментами ключевого звена АО комплекса.

1) Вероятно, существует конкуренция между СОД и каталазой, с одной стороны, и каротиноидами – с другой, за субстраты СОАР и H_2O_2 , что может быть связано с более высоким сродством отдельных видов каротиноидов к указанным видам АФК. Подобное предполагалось нами ранее в отношении аналогичных корреляционных связей у анафары [6].

Вероятно, при нейтрализации СОАР каротиноиды, конкурируя с СОД за этот субстрат, могут способствовать снижению активности фермента. Как следствие, количество пероксида водорода, образуемого в реакции дисмутации СОАР, будет невелико, что, очевидно, может определять и невысокую активность каталазы. Эти процессы, в свою очередь, могут способствовать также уменьшению генерации $\text{OH}^\bullet$, так как СОАР и H_2O_2 , реагируя друг с другом, способны образовывать этот радикал [35, 37, 39]. Кроме того, в случае доминирования каротиноидов в обезвреживании $^1\text{O}_2$ может происходить и снижение синтеза СОАР, что также может вести к более низкой активности СОД. Как известно, каталаза расщепляет не только H_2O_2 , но и гидроперекиси жирных кислот. В этой связи удаление каротиноидами синглетного кислорода, окисляющего жирные кислоты липидов мембран с образованием гидроперекисей [35, 37, 39], может способствовать и уменьшению активности каталазы. Это подтверждают наши результаты – при более высоком содержании пигментов

наблюдаем существенно более низкую активность обоих ферментов, и наоборот.

2) Возможно, в высоких концентрациях ряд каротиноидов проявляет свои прооксидантные свойства [34, 38], что способствует более низкой активности СОД и каталазы. Это может быть связано с частичной инактивацией этих ферментов в случае увеличения содержания АФК на фоне прооксидантных свойств каротиноидов: как известно, повышенные концентрации СОАР и H_2O_2 могут оказывать ингибирующее действие на СОД и каталазу [35]. Кроме того, в ряде исследований, в том числе и на моллюсках, показано участие СОАР и H_2O_2 в образовании $\text{OH}\cdot$ [25] — одного из наиболее реакционноспособных видов АФК, участвующего в продолжении и разветвлении цепей СРО [35]. Вероятно, рост уровня указанных видов АФК при повышенных концентрациях каротиноидов в тканях сердцевидки также может вести к снижению активности СОД и каталазы. Характер взаимосвязи между содержанием каротиноидов и активностью как СОД, так и каталазы, подтверждается и взаимодействием между активностью самих ферментов — выявлена прямая положительная связь ($R^2 = 0.99$), что отражает тесную кооперацию между СОД и каталазой, последовательно обезвреживающих СОАР и H_2O_2 в клетке.

Сравнительный анализ взаимосвязи содержания каротиноидов и параметров АО системы у разных гидробионтов. Был выполнен сравнительный анализ выявленной нами зависимости между ССК и компонентами АО комплекса у сердцевидки с аналогичными данными у исследованных ранее анадары [7, 43], мидии [44, 45], устрицы [46], других гидробионтов [47].

В отличие от сердцевидки, у анадары положительная взаимосвязь выявлена только между ССК и глутатионом, тогда как с ГП и ГР — отрицательная [7]. Это может быть связано с физиологическими особенностями этих моллюсков и спецификой их АО защиты. Анадара имеет эритроцитарный гемоглобин, обеспечивающий необходимый моллюску кислородный режим [43], что отличает ее от сердцевидки. При этом оба моллюска обитают на поверхности донных осадков и могут неглубоко погружаться в их верхний слой [22, 43]. Характерной особенностью сердцевидки является тот факт, что она всегда находится в состоянии частичного погружения в слой осадков [22], что, вероятно, в условиях дефицита кислорода на дне способствует развитию у моллюска гипоксии. Развитие гипоксических состояний у сердцевидки как донного зарывающегося моллюска тем более вероятно, что ряд прибрежных акваторий Черного моря в настоящее время относят к постоянным гипоксическим зонам [5]. В связи с этим жабры сердцевидки могут испытывать большую окислительную нагрузку, чем у анадары. Это также может объяснять выяв-

ленную нами прямую взаимосвязь между содержанием каротиноидов и компонентами АГС у сердцевидки, что, возможно, обеспечивает дополнительную АО защиту моллюска. Такое сочетанное АО действие компонентов АГС и каротиноидов, возможно, позволяет осуществлять более гибкую регуляцию СРО и поддерживать необходимый в тканях сердцевидки АО-прооксидантный баланс.

У мидии картина была несколько другая, чем у исследованной нами сердцевидки. Наиболее выраженная связь установлена между ССК и уровнем глутатиона ($R^2 = 0.99$), а также — активностью каталазы ($R^2 = 0.96$). С остальными показателями АО комплекса и ПОЛ — активностью ГП, ГР, СОД и уровнем ПОЛ — выраженной взаимосвязи у мидии не выявлено [44, 45]. Это указывает на участие каротиноидов в АО реакциях совместно с разными звеньями АО защиты у мидии: как с системой, удаляющей преимущественно физиологические концентрации АФК (АГС), так и с ключевыми АО ферментами, утилизирующими АФК в высоких концентрациях при развитии окислительного стресса (СОД-каталаза).

В отличие от мидии, взаимодействие каротиноидов и АО комплекса у исследованных нами сердцевидки и ранее — анадары [7] имело другой характер. У этих видов моллюсков обнаружена прямая связь каротиноидов только с АГС, инактивирующей невысокие концентрации АФК. Вероятно, совместного АО действия каротиноидов и АГС у анадары и сердцевидки достаточно для поддержания оптимального антиоксидантно-прооксидантного равновесия в тканях. Это подтверждает выводы о большей устойчивости к окислительной нагрузке у этих зарывающихся моллюсков по сравнению с мидией и другими прикрепленными двустворками, сделанные ранее [8, 21, 22, 25].

О важной роли взаимодействия каротиноидов и АО системы говорят и результаты исследования [46]. Корреляционный анализ показал, что в тканях жемчужной устрицы *Pinctada fucata* ССК имело прямую линейную связь с общей АО активностью (ОАО) и степенью выживаемости моллюсков. Анализ взаимосвязи ССК с активностью СОД, каталазы и уровнем ПОЛ при адаптации устриц к высокой температуре воды ($+30^\circ\text{C}$) выявил, что при повышенном ССК значения этих показателей снижались. Авторы связывают это с проявлением АО действия каротиноидов и, как следствие, усилением АО системы, снижением уровня ПОЛ и ростом выживаемости устриц в условиях температурного стресса.

Как показано И.И. Рудневой [47], на ранних стадиях эмбриогенеза у ряда видов черноморских моллюсков, ракообразных и рыб велика защитная АО роль каротиноидов и других низкомолекулярных антиоксидантов (глутатиона, витаминов А, Е, К). Затем в процессе эмбриогенеза концентрация

этих веществ уменьшалась, в то время как активность АО ферментов, напротив, увеличивалась. Это подтверждается выраженной обратной зависимостью между ними ($r > 0.90$). Автор предполагает, что при вылуплении личинок АО ферменты являются основным механизмом защиты от окисления и рост их активности связан с усилением окислительной нагрузки при прямом контакте личинок со средой. Однако роль каротиноидов возрастает на следующих этапах жизненного цикла. Личинки исследованных видов, активно питаясь микроводорослями, получают из них каротиноиды и накапливают их в организме. Это чрезвычайно важно для АО защиты развивающихся молодых особей.

Кроме того, автор связывает уровень АО защиты со степенью защищенности яиц и цист [47]. Так, цисты артемии покрыты компактными оболочками, а яйца хрящевых рыб развиваются до вылупления в материнском организме, поэтому их эмбрионы лучше защищены от воздействия окружающей среды, в то время как моллюски, креветки и костистые рыбы развиваются в воде, и оболочка их яиц очень тонкая (4–5 нм). Следовательно, их развивающиеся эмбрионы менее защищены от повреждения кислородом, а активность важнейшего АО фермента СОД и уровень каротиноидов – в 2.5–13.5 раза выше, чем у хрящевых рыб и артемии.

Эти результаты подтверждают наше предположение об особой важности взаимосвязей между каротиноидами и АО системой у моллюсков. Меньшая защищенность эмбрионов моллюсков от действия среды, чем у артемии, хрящевых рыб [47], а также неподвижный или малоподвижный образ жизни моллюсков, фильтрационный способ питания, в отличие от рыб, ракообразных, обуславливают больший контакт со средой и более высокие риски окислительного повреждения у двустворок по сравнению с указанными гидробионтами. А в случае сердцевидки дополнительную окислительную нагрузку создают способность *C. glaucum* к зарыванию в грунт и гипоксические условия бентосной среды. В этой связи для моллюсков в целом и сердцевидки в частности, особенно возрастает значение защитных молекулярных систем, к числу которых относятся АО комплекс и каротиноиды.

Как известно, высокое содержание каротиноидов у двустворок относят к биохимическим механизмам адаптаций моллюсков к неблагоприятным условиям среды, в частности – к дефициту кислорода [24, 28]. Возможно, выявленные нами особенности служат осуществлению известного принципа каскадного участия разных компонентов АО системы в инактивации АФК и продуктов ПОЛ [35, 39] при развитии таких условий. По всей вероятности, менее специализированные антиоксиданты – каротиноиды, GSH и другие – вступают в АО реакции в отношении разных видов АФК. А специализированные АО ферменты – СОД и каталаза, на-

против, осуществляют последовательную инактивацию только определенных видов АФК (СОАР, H_2O_2) в высоких концентрациях. Действительно, функцией СОД и каталазы, как известно, является расщепление СОАР и H_2O_2 в больших количествах. Эти 2 фермента являются «аварийными», необходимыми в случае лавинообразного нарастания АФК в клетке [35, 37, 39]. Вероятно, в тканях сердцевидки на фоне сравнительно низкого уровня ПОЛ, выявленного нами, основное АО действие осуществляет система высокого сродства к субстрату – АГС, а также неспециализированные антиоксиданты – каротиноиды. Система ключевых АО ферментов, СОД и каталаза, вероятно, не проявляют у сердцевидки высокой активности при большом содержании каротиноидов, способных осуществлять широкий ряд АО функций.

В этом видится важный биологический смысл такого «разделения труда» между неспецифическими АО компонентами и специализированными АО ферментами – участие каждого из этих звеньев на своем «участке работы» и на определенной стадии развития процессов ПОЛ. Это важно для поддержания динамического антиоксидантно-прооксидантного равновесия в тканях *C. glaucum*, что во многом определяет устойчивость организма моллюска к окислительному стрессу, его «вписанность в экосистему» [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлены корреляционные отношения между суммарным содержанием каротиноидов и показателями АО комплекса и ПОЛ в тканях двустворчатого моллюска *C. glaucum*. Прямая взаимосвязь установлена между содержанием каротиноидов и компонентами антиоксидантной глутатионовой системы – уровнем GSH ($R^2 = 0.98$) и активностью ГП ($R^2 = 0.84$). Это отражает возможное синергическое взаимодействие между этими системами в АО реакциях. Обратная зависимость установлена между уровнем каротиноидов и активностью ферментов ключевого звена АО комплекса – СОД и каталазы ($R^2 = 0.97$ и 0.98), что связано с возможным антагонистическим конкурентным характером взаимодействия этих двух систем при инактивации одних и тех же видов АФК. Между содержанием продуктов ПОЛ и каротиноидов взаимосвязи не обнаружено. Установленные зависимости отражают особенности взаимодействия системы каротиноидов и АО комплекса и их роль в формировании приспособительных реакций сердцевидки *C. glaucum* при адаптации к среде обитания. Полученные результаты могут также служить основой для дальнейших исследований с целью получения из тканей сердцевидки БАВ с антиоксидантными свойствами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа подготовлена по теме государственного задания ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”, номер гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4 от 14/02/2018.

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. Matsuno T. Aquatic animal carotenoids. Fish. Sci. (Tokyo, Jpn.). 67 (5): 771–783. 2001.
2. Leontarakis P.K., Loukia I., Xatzianastasiou L.I., Theodorou J.A. Biological aspects of the lagoon cockle, *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1879), in a coastal lagoon in Keramoti, Greece in the Northeastern Mediterranean. J. Shellfish Res. 27 (5): 1171–1175. 2008.
3. Letendre F., Leboulenger J., Durand F. Oxidative challenge and redox sensing in molluscs: effects of natural and anthropic stressors. in Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell Signaling. Eds: T. Farooqui, A.A. Farooqui. Hoboken. NJ. Wiley-Blackwell. 2011.
4. Maoka T. Carotenoids in Marine Animals. J. Agric. Food Chem. 9: 278–293. 2011.
5. Woo S., Denis V., Won H. Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia. Zool. Stud. 52 (15): 1–8. 2013.
6. Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Бородина А.В., Головина И.В. Качественный состав каротиноидов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в тканях двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* (Bruguere, 1789). Ж. эвол. биохим. и физиол. 49 (4): 255–263. 2013. [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 inaequalis* (Bruguere, 1789). J. Evol. Biochem. Phys. 49 (4): 389–398. 2013. (in Russ)].
7. Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Бородина А.В., Головина И.В. Глутатионовый антиоксидантный комплекс и качественный состав каротиноидов тканей двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Ж. эвол. биохим. и физиол. 53 (4): 257–264. 2017. [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. Phys. 53 (4): 289–297. 2017. (in Russ)].
8. 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 Obshchei Biologii. 79 (6): 483–493. 2018. (in Russ)].
9. Maria V.L., Bebianno M.J. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 154 (1): 56–63. 2011.
10. Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Функциональные состояния антиоксидантного ферментного комплекса тканей *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях окислительного стресса. Ж. эвол. биохим. и физиол. 50 (3): 183–189. 2014. [Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Golovina I.V. Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress. J. Evol. Biochem. Phys. 50 (3): 206–214. 2014. (in Russ)].
11. Woodall A.A., Britton G., Jackson M.J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. Biochim. Biophys. Acta. 1336: 575–586. 1997.
12. Carotenoids. Natural Functions. Ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. Birkhauser. Basel. Switzerland. 4: 370. 2008.
13. Suhnel S., Lagreze F., Ferreira J.F. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). Brazilian Journal of Biology. 69 (1): 209–215. 2009.
14. Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В., Бородина А.В. Содержание каротиноидов и состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Br. 48 (6): 542–547. 2012 [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 inaequalis* Br. J. Evol. Biochem. Physiol. 49 (3): 309–315. 2013. (in Russ)].
15. Freitas R., Costa E., Velez C. Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination: Comparison between the bivalve *Cerastoderma edule* and the Polychaete *Diopatra neapolitana*. Ecotoxicol. Environ. Safety. 75: 109–118. 2012.
16. Marques A., Pilo D., Araujo O., Pereira F., Guilherme S., Carvalho S., Santos A.M., Pacheco M., Pereira P. Propensity to metal accumulation and oxidative stress responses of two benthic species (*Cerastoderma edule* and *Nephtys hombergii*): are tolerance processes limiting their responsiveness? Ecotoxicology. 25 (4): 664–676. 2016.

17. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Каротиноиды как основа для создания лечебно-профилактических средств. Российский биотерапевтический журнал. 8 (4): 91–98. 2009. [Shashkina M.Y., Shashkin P.N., Sergeev A.V. Carotenoids as a base for development of cancer chemoprevention. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 8 (4): 91–98. 2009. (in Russ)].
18. Беседнова Н.Н. Морские гидробионты – потенциальные источники лекарств. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 3 (57): 4–10. 2014. [Besednova N.N. Sea hydrobionts – potential sources of drugs. Health. Medical ecology. Science. 3 (57): 4–10. 2014. (in Russ)].
19. Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulange F. The point about oxidative stress in mollusks (Review). ISJ. 2: 91–104. 2005.
20. Бельчева Н.Н., Довженко Н.В., Истомина А.А., Жуковская А.Ф., Кукла С.П. Антиоксидантная система мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) и приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Mollusca: Bivalvia). Биология моря. 42 (5): 375–380. 2016. [Belcheva N.N., Dovzhenko N.V., Istomina A.A., Zhukovskaya A.F., Kukla S.P. The antioxidant system of the Gray's mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) and the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Mollusca: Bivalvia). Biol. morya. 42 (5): 375–380. 2016. (in Russ)].
21. Гостюхина О.Л., Андреев Т.И. Тканевый обмен и состояние антиоксидантного комплекса у черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) с разной устойчивостью к окислительному стрессу. Биология моря. Т. 45 (3): 197–207. 2019. [Gostyukhina O.L., Andreenko T.I. Tissue Metabolism and the State of the Antioxidant Complex in the Black Sea Mollusks *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) and *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 with Different Tolerances to Oxidative Stress. Russ. J. Mar. Biol. 45 (3): 211–220. 2019. (in Russ)].
22. Boyden C.R. The Behaviour, Survival and Respiration of the Cockles *Cerastoderma Edule* and *C. Glaucum* in Air. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 52 (3): 661–680. 1972.
23. Welker A.F., Moreira D., Campos E., Hermes-Lima M. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol. 165 (4): 384–404. 2013.
24. Фокина Н.Н., Нефедова З.А., Немова Н.Н. Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (Обзор). Труды Карельского НЦ РАН. 3: 121–130. 2011. [Fokina N.N., Nefedova Z.A., Nemova N.N. Biochemical adaptations of marine bivalves to anoxic conditions (review). Trudy Karel'skogo nauchnogo centra RAN. 3: 121–130. 2011. (in Russ)].
25. Viarengo A., Canesi L., Garcia Martinez P., Peters L.D., Livingston D.R. Pro-oxidant processes and antioxidant defense systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. 111 (1): 119–126. 1995.
26. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Роль каротиноидов в профилактике наиболее распространенных заболеваний. Российский биотерапевтический журнал. 9 (1): 77–86. 2010. [Shashkina M.Y., Shashkin P.N., Sergeev A.V. Carotenoids in human health and prevention of diseases. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 9 (1): 77–86. 2010. (in Russ)].
27. Maoka T., Akimoto N. Natural product chemistry in carotenoid some experimental techniques for structural elucidation and analysis of natural carotenoids. Carotenoid Science. 13: 10–17. 2008.
28. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М. Наука. 1988. [Karnaukhov V.N. Biologicheskie funktsii karotinoidov. Moskva. Nauka. 1988. (in Russ)].
29. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. 11: 20–23. 1989. [Pereslegina I.A. The activity of antioxidant enzymes in the saliva of healthy children. Laboratornoe Delo. 11: 20–23. 1989. (in Russ)].
30. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. Occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 849–854. 1972.
31. Гурин С.В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах. Лабораторная диагностика. 4: 45–46. 1999. [Gurin S.V. Modification of method of determination of catalase activity in biological substrates. Laboratornaya Diagnostika. 4: 45–46. 1999. (in Russ)].
32. Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях. Методы биохим. исслед. Ленинград. Изд-во ЛГУ. 1982. [Putilina F.E. Determination of reduced glutathione content in tissues. In: Metody biokhimicheskikh issledovaniy (Methods of Biochemical Research). Leningrad. Leningrad. Gos. Univ. 1982. (in Russ)].
33. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95 (1): 351–358. 1979.
34. Yeum K.J., Aldini G., Russell R.M., Krinsky N.I. Antioxidant/Pro-oxidant Actions of Carotenoids. In: Britton G., Pfander H., Liaen-Jensen S. (eds.) Carotenoids. Carotenoids. V. 5. Switzerland. Basel. Birkhäuser. 2009.
35. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов. Успехи современной биологии. 113 (4): 442–455. 1993. [Men'shchikova E.B., Zenkov N.K. Antioxidants and inhibitors of radical oxidative processes. Uspekhi Sovremennoy Biologii. 113 (4): 442–455. 1993. (in Russ)].
36. Shimidzu N., Goto M., Miki W. Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms. Fish. Sci. (Tokyo, Jpn.). 62 (1): 134–137. 1996.
37. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме. Успехи биологической химии. 31: 180–189. 1990. [Osipov A.N., Azizova O.A., Vladimirov Y.A. Aktivnye formy kisloroda i ikh rol' v organisme [Active oxygen forms and their role in the organism]. Uspekhi biologicheskoy khimii. 31: 180–189. 1990. (in Russ)].

38. Поляков Н.Э., Лешина Т.В. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексобразование. Успехи химии. 75: 1175–1192. 2006. [Polyakov N.E., Leshina T.V. Certain aspects of the reactivity of carotenoids. Redox processes and complexation. Russ. Chem. Rev. 75 (12): 1049–1064. 2006. (in Russ)].
39. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М. Фирма “Слово”. 2006. [Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. Okislitel'nyi stress. Prooksidanty i antioksidanty [Oxidative Stress. Prooxidants and Antioxidants]. Moscow. Slovo. 2006. (in Russ)].
40. Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. Oxid. Med. Cell. Longevity. 211: 1–9. 2011.
41. Венгеровский А.И. Фармакологические подходы к регуляции функций печени. Бюллетень сибирской медицины. 1: 25–29. 2002. [Vengerovsky A.I. Pharmacological methods of regulation of liver functions. Bulletin' sibirskoy medicyny. 1: 25–29. 2002 (in Russ)].
42. Trevisan R., Mello D., Delapiedra G., Silva D., Arl M., Danielli N., Dafre A. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. Aquat. Toxicol. 173: 105–119. 2016.
43. Broom M.J. The biology and culture of marine bivalve mollusks of the genus *Anadara*. ICLARM Studies and Reviews 12. International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila. Philippines. 1985.
44. Солдатов А.А., Александрова О.Л., Головина И.В., Столбов А.Я. Ферментативная система антиоксидантной защиты у черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. с пигментированными и депигментированными тканевыми структурами. Доклады Национальной академии наук Украины. 5: 162–170. 2003.
45. Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских двустворчатых моллюсков. Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. Севастополь. ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014 [Gostyukhina O.L., Soldatov A.A., Golovina I.V. Antioksidantnyj fermentnyj kompleks tkanej chernomorskih dvustvorchatykh mollyuskov. Chernomorskie mollyuski: elementy sravnitel'noj i ekologicheskoy biohimii. [Antioxidant enzyme complex of tissues of Black Sea bivalve shellfish. Black Sea clams: elements of comparative and ecological biochemistry]. Sevastopol. EKOSI-Gidrofizika. 2014 (in Russ)].
46. Meng Z., Zhang B., Liu B., Li H., Fan S., Yu D. High carotenoids content can enhance resistance of selected *Pinctada fucata* families to high temperature stress. Fish Shellfish Immunol. 61: 211–218. 2017.
47. Rudneva I. I. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 122 (2): 265–271. 1999.

Carotenoid Content and Antioxidant Status in Tissues of the Eurybiontic Bivalve Mollusk *Cerastoderma Glaucum* (Cardiidae)

O. L. Gostyukhina^{a,*} and A. V. Borodina^{a,**}

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

^{*}e-mail: gostolga@yandex.ru

^{**}e-mail: borodinaav@mail.ru

The relationship between the total carotenoid content and the state of the antioxidant (AO) complex was studied in tissues of the eurybiontic Black Sea bivalve mollusk *Cerastoderma glaucum* (Bruguère, 1789) from natural habitats which has a high oxidative stress tolerance. In the hepatopancreas, gills and foot, the total carotenoid content, glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and catalase activities, as well as the level of reduced glutathione (G-SH) and TBA-reactive products were determined. A direct correlation was established between the total carotenoid content and the GSH level ($R^2 = 0.98$) and GP activity ($R^2 = 0.84$). This reflects a possible synergistic interaction between these systems when performing AO functions. An inverse relationship was found between the total carotenoid content and SOD and catalase activities ($R^2 = 0.97$ and 0.98 , respectively), which may relate to a possible competitive interrelationship of these two systems. The revealed correlations reflect specific interrelationships between carotenoids and the AO complex in the clam *C. glaucum*, as well as their role in the formation of adaptive responses of the mollusk to oxidative stress. They can also serve a starting point for further research aimed at obtaining biologically active substances with antioxidant properties from mollusk tissues.

Keywords: carotenoids, antioxidant complex, bivalves, oxidative stress, adaptation, biologically active substances