



ЧЕРНОМОРСКИЕ МОЛЛЮСКИ:

элементы сравнительной и
экологической биохимии



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. Ковалевского

**ЧЕРНОМОРСКИЕ МОЛЛЮСКИ:
элементы сравнительной и
экологической биохимии**

Севастополь
2014

УДК [594:577.1 (262.5)]

Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии / Под ред. Г.Е. Шульмана, А.А. Солдатова; Институт биологии южных морей НАН Украины. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2014. - 323 с. (138 илл., 63 табл.)

В монографии приводится подробная сводка о видовом разнообразии малакофауны Черного моря. Особое внимание уделено состоянию ряда молекулярных систем и динамике метаболических процессов в тканях массовых видов моллюсков. Значительный объем монографии посвящен антиоксидантному ферментному комплексу тканей. Впервые приводятся результаты подробной идентификации качественного состава каротиноидов. Обсуждается природа цветового полиморфизма раковин мидии. Представлены результаты исследований особенностей адаптивной реорганизации тканевого метаболизма у моллюсков в условиях аноксии, голодания, токсических нагрузок, состоянии нереста.

Предназначена для гидробиологов, зоологов, физиологов и биохимиков, связанных с изучением морских организмов.

Чорноморські молюски: елементи порівняльної і екологічної біохімії / Під ред. Г.Є. Шульмана, О.О. Солдатова; Інститут біології південних морів НАН України. - Севастополь: ЭКОСИ-Гідрофізика, 2014. - 323 с. (138 іл., 63 табл.)

В монографії приводиться докладні відомості про видове різноманіття малакофауни Чорного моря. Особлива увага надана стану ряду молекулярних систем і динаміки метаболічних процесів у тканинах масових видів молюсків. Значний об'єм монографії присвячений антиоксидантному ферментному комплексу тканин. Вперше надаються результати докладної ідентифікації якісного складу каротиноїдів. Обговорюється природа кольорового поліморфізму черепашок мідії. Представлені результати досліджень особливостей адаптивної реорганізації тканинного метаболізму у молюсків в умовах аноксії, голодування, токсичних навантажень, стані нересту.

Призначена для гідробіологів, зоологів, фізіологів і біохіміків, зв'язаних з вивченням морських організмів.

Black sea molluscs: elements of comparative and environmental biochemistry (Ed. G. E. Shulman, A.A. Soldatov; Institute of Biology of Southern Seas of NASU. - Sevastopol: EKOSI-Gidrofisika, 2014. – 323 p. (138 ill., 63 tables).

The monograph provides a detailed summary of the species diversity of the Black sea malacofauna. Special attention is paid to the state of some molecular systems and the dynamics of metabolic processes in the tissues of mass species of molluscs. A significant part of this monograph is devoted to antioxidant enzyme complex in tissues. For the first time the results of detailed identification of qualitative composition of carotenoids are shown. The nature of color polymorphism of mussels' shells is discussed. The results of research in the field of adaptive reorganization characterization of the mollusks' tissue metabolism in conditions of anoxia, starvation, toxic load, the state of spawning are present.

Designed for marine biologists, zoologists, physiologists and biochemists related to the study of marine organisms.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
НАН Украины, 2014

ISBN 978-966-02-7258-3

ВВЕДЕНИЕ

Моллюски являются важнейшим компонентом бентосных сообществ Черного моря. Формирование современной малакофауны данного бассейна происходило на протяжении почти 8 тыс. лет [Димитров, Димитров, 2008; Анистратенко, Анистратенко, 2012]. Решающее значение сыграли события, произошедшие в голоцене и приведшие к соединению средиземноморского и понто-каспийского фаунистических комплексов [Анистратенко и др., 2007; Анистратенко, Анистратенко, 2012]. На «медитерранизацию» черноморского региона в свое время обратил внимание профессор И.И. Пузанов [Пузанов, 1965; 1967]. Следует отметить, что этот процесс продолжается и в настоящее время. Свидетельством тому является относительно недавнее проникновение в Черное море брюхоногого моллюска *Rapana venosa*, двустворчатых моллюсков *Mya arenaria* и *Anadara inaequalis*, которые образовали не только устойчивые популяции, но и стали массовыми, сформировав, в ряде случаев, относительно стабильные во времени зооценозы [Чухчин, 1984; Gomoiu, 1984; Золоторев, Золоторев, 1987]. В последнее время все большее значение в расширении видового разнообразия приобретает и процесс интродукции моллюсков, в частности тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*), которую рассматривают как перспективный объект марикультуры [Золотницкий, 2002].

Во второй половине прошлого столетия после работ Г.Г. Винберга и В.С. Ивлева в гидробиологии получили широкое распространение балансовые методы изучения энергетического обмена гидробионтов [Винберг, 1956; 1979; Ивлев, 1966; 1977]. Основным (модельным) объектом исследования для черноморского региона стал двустворчатый моллюск *Mytillus galloprovincialis* Lam., как наиболее массовый ценозообразующий вид, используемый для промышленного выращивания. На нем был апробирован широкий спектр современных физиологических и биохимических методов исследования и установлен ряд интересных закономерностей.

Значительный объем работ был выполнен по трофологии моллюска. Оценена его фильтрационная активность, изучены пищевые рационы и интенсивность питания, определены скорости соматического и генеративного роста, рассчитан энергетический бюджет [Аболмасова, 1978; Финенко и др., 1990]. Эти работы имели не только теоретическое, но и практическое значение. Фактически они заложили научные основы для создания современных морских ферм занимающихся товарным выращиванием мидий.

Применение интегральных методов оценки интенсивности энергетического обмена (непрямая калориметрия, экскреция аммонийного азота) позволило установить факт использования белков в качестве энергетических субстратов в условиях анаэробнозиса [Шульман и др., 1993; Shulman, Love, 1999; Shulman et al., 2002]. Эта закономерность в дальнейшем была показана и для других систематических групп гидробионтов [Шульман и др., 1993; Shulman, Love, 1999]. Установлена обратная зависимость между энергетическими и пластическими процессами в тканях молодого черноморского мидии [Шульман, Вялова, 2000]. Последнее имеет общебиологическое значение.

Особого внимания заслуживают исследования динамики процессов тканевого метаболизма у *Mytillus galloprovincialis* Lam. в течение годового цикла, в условиях нормоксии и гипоксии [Шапиро, Бабкова, 1975; Горомосова, Таможняя,

Введение

1979; 1980]. Авторы определили активность ключевых ферментов гликолиза, дикарбонового участка цикла Кребса, процессов переаминирования и глюконеогенеза, а также содержание в тканях ряда субстратов и метаболитов. Это позволило им выявить группу процессов, лежащую в основе устойчивости черноморской мидии к дефициту кислорода. Основным результатом работы этого коллектива авторов явилась первая для черноморского региона монографическая сводка по биохимии энергетического обмена мидии, которая стала настольным руководством для многих исследователей [Горомосова, Шапиро, 1984].

В последнее время существенно расширился интерес к другим видам черноморских моллюсков: хищной рапане, экстремобионтному моллюску-вселенцу анадаре, тихоокеанскому интродуценту – устрице. Исследуются не только интегральные характеристики обмена [Золотницкий, Монина, 1992; Золотницкий, 2002], но и состояние отдельных молекулярных систем (антиоксидантный ферментный комплекс, качественный и количественный состав каротиноидов) [Soldatov et al., 2007; Гостюхина, Головина, 2012; Бородина и др., 2010; Гостюхина и др., 2010; 2012; Маока et al., 2011; Головина и др., 2011; Солдатов и др., 2013], метаболические процессы на тканевом и клеточном уровнях [Солдатов и др., 2008; 2009; 2010; Андреевко и др., 2009; Новицкая, Солдатов, 2013].

Предлагаемая вниманию читателя монография – это результат обобщения работ по сравнительной и экологической биохимии черноморских моллюсков, которые проведены в отделе физиологии животных и биохимии Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины за последние 15 лет.

Монография включает 7 глав. В **первой главе** рассматривается структура таксоцена черноморских моллюсков и процессы, стоящие за его формированием. **Вторая глава** посвящена антиоксидантному ферментному комплексу трех видов двустворчатых моллюсков (мидии, анадары, устрицы). Рассматривается тканевая специфика его организации, состояние в условиях естественного и искусственного окислительного стресса. Обсуждаются пути его использования в качестве инструмента экодиагностики. **Третья глава** связана с определением качественного состава и содержания каротиноидов в тканях брюхоногих (рапана) и двустворчатых моллюсков (мидии, анадары, устрицы). Особое внимание уделяется процессам трансформации этих соединений в трофической цепи: водоросли → моллюски-фильтраторы → моллюски-хищники. В **четвертой главе** представлены результаты исследований особенностей течения процессов тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца – анадары в условиях нормоксии, экспериментальной аноксии и голодания. В **пятой главе** приведены материалы по функциональной морфологии эритроидных элементов гемолимфы анадары. **Шестая глава** посвящена проблеме цветового полиморфизма раковины черноморской мидии. Предлагаются новые методические разработки и оценивается эффективность их применения. В **седьмой главе** рассматриваются процессы соматического роста и регенерации тканей у двустворчатых моллюсков на основе применения индекса РНК/ДНК.

Представленные в монографии материалы получены на протяжении 1995-2012 г.г. в рамках госбюджетных тем НАН Украины: «Эколого-физиологические и физиолого-биохимические основы существования популяций животных в сообществах и экосистемах Черного моря» (№ госрегистрации 01.9.10 056168); «Метаболические основы существования массовых видов беспозвоночных и рыб в

Введение

условиях меняющего режима Черного моря» (№ 0196U022102); «Структурно-функциональные основы продукционных процессов у гидробионтов» (№ 0199U001389); «Биохимические и метаболические стратегии, которые обеспечивают функциональное биоразнообразие гидробионтов» (№ 0103U001049). Общее руководство темами осуществлялось член-корреспондентом НАН Украины Г.Е. Шульманом.

Авторы выражают признательность старшему научному сотруднику ИнБЮМ НАН Украины, кандидату химических наук М.В. Нехорошеву и доктору Т. Маока (Research Institute For Production Development, Japan) за консультации и помощь в определении качественного состава каротиноидов в тканях моллюсков.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Глава 2

АО – антиоксидант, антиоксидантный
АОС – антиоксидантная система
АФК – активные формы кислорода
ГП – глутатионпероксидаза
ГС – глутатионовая система
ГР – глутатионредуктаза
ДТ – депигментированные ткани
МДА – малоновый диальдегид
ОС – окислительный стресс
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СОАР – супероксидный анион-радикал
СОД – супероксиддисмутаза
СР – свободнорадикальный
СРО – свободнорадикальное окисление
ТБК-активные продукты – активные продукты 2-тиобарбитуровой кислоты
ТДТМА – тетрадецилтриметиламмоний бромид
GSH – глутатион восстановленный
GSSG – глутатион окисленный

Глава 3

ИнБЮМ НАНУ – Институт биологии южных морей Национальной академии наук Украины;
КХ – колоночная хроматография
M⁺ – положительно заряженный ион – радикал;
br.s – общий синглет (в *H'-NMR*);
CD – круговой дихроизм;
d – дуплет (в *H'-NMR*);
Et₂O – диэтиловый эфир;
FAB MS – метод масс-спектрометрии с бомбардировкой ускоренными атомами;
H'-NMR – метод протонно-ядерного магнитного резонанса;
HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография
m – мультиплет (в *H'-NMR*);
m/z – отношение массы к заряду ее иона;
MS – масс спектр;
NMR – ядерно-магнитный резонанс
ODS – обращенная фаза на колоночной или HPLC хроматографии
q – квартет (в *H'-NMR*);
R_f – величина, равная отношению расстояния пройденного пигментом к расстоянию, пройденному растворителем;
s – синглет (в *H'-NMR*);
TLC – тонкослойная хроматография (ТСХ)
TMS – тетраметилсилан;
UV-VIS – спектр видимой области (400 – 800 нм);
ГП – гепатопанкреас;

Перечень условных сокращений

Глава 4

АДФ – аденозиндифосфат
АлАТ – аланинаминотрансфераза
АсАТ – аспаратаминотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфат
АМФ – аденозинмонофосфат
АЭЗ – аденилатный энергетический заряд Аткинсона
ГП - гепатопанкреас
ГТФ – гуанозинтрифосфат
ИМФ – инозинмонофосфат
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
МДГ – малатдегидрогеназа
НАД+ – адениндинуклеотид
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ФЕПМКК - фосфоенолпируваткарбоксикина
Ф_и – неорганический фосфат
ФП – фосфорильный потенциал
ЩФ – щелочная фосфатаза
НbI и *НbII* – типы гемоглобина
HIF-1 – индуцируемый при гипоксии фактор 1
LC₁₀₀ – летальная концентрация кислорода
LC₅₀ – пороговая концентрация кислорода
SLC₅₀ – сублетальная концентрация кислорода
γ-ГТП – гамма-глутамилтранспептидаза

Глава 5

C₁ – большая ось клетки, мкм;
C₂ – малая ось клетки, мкм;
C₁ – C₂ – разница между большой и малой осями клетки, мкм;
V_c – средноклеточный объем, мкм³;
S_c – площадь поверхности клетки, мкм²;
S_c/V_c – удельная поверхность клетки, мкм⁻¹;
N₁ – большая ось ядра, мкм;
N₂ – малая ось ядра, мкм;
N₁–N₂ – разница между большой и малой осями ядра, мкм;
V_n – объем ядра, мкм³;
S_n – площадь поверхности ядра, мкм²;
S_n/V_n – удельная поверхность ядра, мкм⁻¹;
V_n/V_c – ядерно-плазматическое отношение .

Глава 6

R – красный компонент цвета в системе RGB;
G – зеленый компонент цвета в системе RGB;
B – синий компонент цвета в системе RGB;
H – оттенок цвета в системе HSB;

Перечень условных сокращений

S – насыщенность цвета в системе HSB;
B – яркость цвета в системе HSB;
A – показатель асимметрии.;
x_{np} – значение изучаемой характеристики правой створки;
x_{лв} – значение изучаемой характеристики правой створки;
n_{ас} – число асимметричных особей;
АЛТ – аланинаминотрансфераза;
АСТ – аспаргатаминотрансфераза;
СОД – супероксиддисмутаза;
СОАР – супер-оксидный анион радикал.

Глава 7

Ч – черный фенотип (морфа)
К – коричневый фенотип (морфа)
Т-К – темно-коричневый фенотип (морфа)
ВПП – выметанные половые продукты
СН – свободные нуклеотиды
АК – аминокислотный пул
ПХБ – полихлорбифениловые соединения
ТДТМА – тетрадецилтриметиламмоний бромид

Глава 1

МОЛЛЮСКИ В МЕНЯЮЩЕЙСЯ ЭКОСИСТЕМЕ ЧЕРНОГО МОРЯ

Дестабилизированная экосистема Черного моря претерпевает в последние десятилетия существенные трансформации в ответ на глобальные климатические изменения (режимов ветров, атмосферных осадков, температуры) и разнообразные антропогенные воздействия [Зайцев, 2006]. Вероятно, в настоящее время она находится в процессе дестабилизации или/и перехода в альтернативное устойчивое состояние. Таксоцены моллюсков Черного моря – важный компонент Черноморской экосистемы: взрослые моллюски в донных сообществах, а их личинки в планктоне, играют важную роль в трофических сетях экосистемы Черного моря [Заика и др., 1990]. Раковины моллюсков являются ведущей составляющей твердых наносов, формирующих пляжи [Ивлиева, 2009; Shadrin et al., 2012]. Деградация пляжей – одна из острейших проблем окружающей среды региона. Ряд видов моллюсков – ценные объекты промысла. В последние годы на Черном море интенсивно развивается марикультура моллюсков [Золотницкий, 2011]. Таксоцены моллюсков в море как важный элемент его экосистемы изменяется, влияя тем самым на дальнейшую трансформацию экосистемы моря. Понимание закономерностей происходящих изменений, соотношения различных причин, вызывающих эти изменения; анализ последствий этих изменений; разработка научных основ прогнозирования возможных дальнейших трансформаций экосистемы моря – актуальнейшие задачи современной морской биологии.

1.1. Разнообразие и роль моллюсков в Черном море

Структура современного таксоцены моллюсков в Азово-Черноморском бассейне, как и всей фауны в целом, сформировалась после восстановления соединения Черного моря со Средиземным через пролив Босфор в голоцене \approx 5600 лет до н.э. [Димитров, Димитров, 2008]. До этого в море сложилась и существовала аборигенная новоэвксинская фауна солоноватоводного характера [Невесская и др., 2006], трансгрессия морских вод позволила ей остаться, в основном, лишь в устьях рек и лагунах/лиманах. История фауны Азово-Черноморского бассейна дана в обзорах [Мордухай-Болтовской, 1960; Старобогатов, 1970]. В современном таксоцене моллюсков Черного и Азовского морей выделяются два основных фаунистических комплекса – средиземноморский и понто-каспийский [Анистратенко и др., 2007].

Среди примерно 2100 видов беспозвоночных животных, отмеченных к настоящему времени в Черном море [Заика и др., 1997], более 200 видов – моллюски [Определитель..., 1972; Сон, 2009].

Современные представители типа Mollusca относятся к восьми хорошо обособленным классам, из которых в Черном море обитают представители только 3 классов [Определитель..., 1972; Сон, 2009]:

1. Панцирные моллюски – Polyplacophora/Loricata – в Черном море представлены 2 отрядами – Chitonida (семейство Lepidochitonidae с 2 видами

Глава 1

– *Lepidochitona cinerea* (Linnaeus, 1767) и *Lepidochitona corrugata* (Reeve, 1848)) и Chitonida (семейство Acanthochitonidae с одним видом – *Acanthochitona fascicularis* (Linnaeus, 1767).

2. Брюхоногие моллюски – Gastropoda – в Черном море характеризуются максимальным видовым разнообразием среди всех классов моллюсков: более 130 видов, которые относятся к 5 подклассам, 24 отрядам, 56 семействам. О разнообразии брюхоногих моллюсков в Черном море на уровне различных таксономических категорий дает представление таблица 1.1.

Таблица 1.1

Список семейств и родов Gastropoda, обитающих в Черном море

Подкласс	Надсемейство	Семейство	Род (число видов)
1	2	3	4
Patellogastropoda Vetigastropoda	Patelloidea	Patellidae	Patella (2)
	Fissurelloidea	Fissureidae	Diodora (1)
Neritimorpha Caenogastropoda	Scissurelloidea	Scissurellidae	Scissurella (1)
	Phasianelloidea	Phasianellidae	Tricolia (2)
	Trochoidea	Turbinidae	Turbo (1)
		Trochidae	Gibbula (7)
	Neritoidea	Calliostomatidae	Calliostoma (2)
		Neritidae	Theodoxus (5)
	Cerithioidea	Turritellidae	Turritella (1)
		Assimineidae	Paludinella (1)
	Rissooidea	Rissoidae	Rissoa (4), Mohrensternia (2), Pusillina (1), Alvania (2), Setia (1)
		Rissooidea	Tornidae
	Rissooidea		Hydrobiidae
		Naticoidea	Caecidae
	Naticoidea		Truncatellidae
		Naticoidea	Naticidae
Littorinoidea	Littorinidae		Melaraphe (1), Littorina (1)
Calyptraeidea	Calyptraeidae	Calyptraea (1)	
Stromboidea	Apporrhaidae	Aporrhais (1)	
Cerithioidea	Cerithiidae	Cerithidium (1), Bittium (1)	
		Cerithiopsis (3-4)	
Triphoroidea	Cerithiopsidae	Cerithiopsis (3-4)	
Buccinoidea	Triphoridae	Triphora (2)	
	Columbellidae	Mitrella (1)	

Моллюски в меняющейся экосистеме Черного моря

1	2	3	4
Heterobranchia	Muricoidea	Nassariidae	Nassarius (2), Cyclope (3)
		Buccinidae	Neptunea (1)?
		Muricidae	Rapana (1), Trophonopsis (2), Ocenebra (1), Siratus (1)
	Conoidea	Mangeliidae	Mangelia (2), Bela (1)
	Eulimoidea	Eulimidae	Eulima (1), Vitreolina (1)
	Epitonioidea	Epitoniidae	Epitonium (2)
	Omalogyroidea	Omalogyridae	Omalogyra (1)
	Murchisonelloidea	Murchisonellidae	Ebala (1), Odostomia (7), Eulimella (3), Noemiamea (1), Chrysallida (6), Turbonilla (2)
	Pyramidelloidea	Pyramidellidae	Acteon (1)
	Acteonoidea	Acteonidae	Haminoea (2)
	Haminoeidea	Haminoeidae	Cylichna (1)
	Philinoidea	Cylichnidae	Retusa (2), Cylichnina (3)
	Limapontioidea	Retucidae	Philine (1)
		Philinidae	Stiliger (1), Limapontia (1), Ercolania (1)
	Parhedyloidea	Parhedyliidae	Pontohedyle (1)
	Acochlidoidea	Acochlidiidae	Microhedyle (1)
	Doridoidea	Dorididae	Doris (2)
Nudibranchia	Dotidae	Doto (2)	
Fionoidea	Pseudovermidae	Pseudovermis (1)	
Dexiarchia	Embletoniidae	Embletonia (1), Tenellia (1), Tergipes (1), Trinchesia (1), Cuthona (1)	
Fionoidea	Tergipedidae	Calmella (1)	
Flabellinoidea	Flabellinidae	Valvata (?)	
Valvatoidea	Valvatidae	Corambe (Doridella) (1)	
Onchidoridoidea	Onchidorididae	Ovatella (1), Myosotella (1)	
Ellobioidea	Ellobiidae		

Глава 1

3. Двустворчатые моллюски – *Bivalvia* – являются второй по разнообразию группой моллюсков в Черном море. Из трех существующих надотрядов двустворчатых моллюсков в море обитают представители двух из них, относящиеся к 4 подклассам, 14 отрядам, 34 семействам (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Список семейств и родов *Bivalvia*, обитающих в Черном море

Подкласс	Отряд	Семейство	Род (количество видов)	
1	2	3	4	
Protobranchia	Nuculida	Nuculidae	<i>Nucula</i> (2)	
	Nuculanoida	Nuculanidae	<i>Nuculana</i> (1)	
Autobranchia	Euheterodonta	Gastrochaenidae	<i>Rocellaria</i> (1)	
Pteriomorpha	Arcoida	Arcidae	<i>Anadara</i> (1-2), <i>Arca</i> (2)	
		Noetiidae	<i>Striarca</i> (1)	
	Mytiloida	Mytilidae	<i>Mytilaster</i> (1), <i>Mytilus</i> (1-2), <i>Modiolus</i> (2), <i>Musculus</i> (1)	
	Ostreoida	Ostreidae	<i>Ostrea</i> (1), <i>Crassostrea</i> (1)	
	Pectinoida	Anomiidae	<i>Anomia</i> (1), <i>Monia</i> (1)	
		Pectinidae	<i>Mimachlamys</i> (1), <i>Flexopecten</i> (1-2), <i>Pecten</i> (2)	
Heterodonta	Limoida	Limidae	<i>Limaria</i> (1)	
	Anomalodesmata	Thraciidae	<i>Thracia</i> (1)	
	Euheterodonta	Hiatellidae	<i>Hiatella</i> (2)	
	Lucinoida	Thyasiridae	<i>Thyasira</i> (1)	
		Lucinidae	<i>Lucinella</i> (1), <i>Loripes</i> (1), <i>Lucinoma</i> (1)	
	Veneroida		Montacutidae	<i>Kurtiella</i> (1)
			Lasaeidae	<i>Hemilepton</i> (1)
		Donacidae	<i>Donax</i> (2)	
		Cardiidae	<i>Acanthocardia</i> (2), <i>Cerastoderma</i> (2), <i>Parvicardium</i> (2), <i>Papillicardium</i> (1), <i>Cardium</i> (1), <i>Monodacna</i> (3), <i>Hypanis</i> (1)	
		Veneridae	<i>Gouldia</i> (1), <i>Pitar</i> (2), <i>Irus</i> (1), <i>Timoclea</i> (1), <i>Clausinella</i> (1), <i>Chamelea</i> (1), <i>Polittapes</i> (3)	
		Petricolidae	<i>Petricola</i> (1)	
		Mactridae	<i>Spisula</i> (2), <i>Mactra</i> (2),	
		Mesodesmatidae	<i>Donacilla</i> (1)	
		Solecurtidae	<i>Solecurtus</i> (1)	
		Semelidae	<i>Abra</i> (4)	
	Psammobiidae	<i>Gari</i> (?)		

Моллюски в меняющейся экосистеме Черного моря

1	2	3	4
		Kelliidae Tellinidae	<i>Kellia</i> (1) <i>Gastrana</i> (1), <i>Moerella</i> (2), <i>Angulus</i> (1)
	Euheterodonta	Dreissenidae Solenidae	<i>Dreissena</i> (4) <i>Solen</i> (1)
	Myoida	Pharidae Myidae	<i>Ensis</i> (2) <i>Mya</i> (1)
		Corbulidae Pholadidae	<i>Corbula</i> (1), <i>Lentidium</i> (1) <i>Pholas</i> (1), <i>Barnea</i> (1)
		Teredinidae	<i>Teredo</i> (2), <i>Lyrodus</i> (1)

Систематика, как и любая наука, находится в развитии, а поэтому меняются названия видов. С получением новых данных, особенно молекулярно-генетических, может пересматриваться их систематическое положение. Какие-то виды признаются невалидными. Следует отметить, что большая часть данных, приведенных в таблицах 1 и 2, взята из известного определителя [Определитель..., 1972]. Однако в систематике произошли существенные изменения – пересмотрена структура различных таксонов, изменены названия отрядов, семейств, родов и т.д., поэтому названия многих таксонов в таблицах не соответствуют тем, что приводятся в цитируемом Определителе. Они все уточнены и даны в соответствии с World Register of Marine Species. Это необходимо помнить, чтобы не было путаницы в работах несистематиков – биохимиков, физиологов, экологов. Нередко наблюдается, что имя вида изменено, а в выходящих работах продолжает использоваться старое невалидное наименование вида; бывает даже, что в списке видов старое и новое названия даются как разные виды. Это, бывает, приводит к путанице и неправомерным сравнениям. Проводя экспериментальные или полевые исследования с каким-либо видом, следует, не будучи уверенным в статусе вида, консультироваться с имеющимися в Интернете базами-регистрами видов. Для морских видов животных можно рекомендовать, например, WoRMS – World Register of Marine Species: www.marinespecies.org/.

Точное количество видов моллюсков, обитающих сейчас в Черном море, назвать невозможно: некоторые один-два раза отмеченные виды, в море больше не находили, какие-то виды вселяются, какие-то, возможно, исчезают, признаются невалидными и т.д. Динамика заселения Черного моря новыми видами моллюсков в последние десятилетия дана в работах [Сон, 2007, 2009]. Следует заметить, что далеко не все виды моллюсков, попавшие в Черное море, смогли создать в нем более-менее устойчивые популяции. М.О. Сон [2009] приводит 11 новых видов, отмеченных в море (*Aporrhais pespelecani* (Linnaeus, 1758), на наш взгляд, неправильно отнесен к вселенцам), из которых лишь 5 видов уже сформировали устойчивые популяции в Черном море, а *Ercolania viridis* (Costa, 1866), возможно, начинает ее создавать в Одесском заливе.

Область распространения моллюсков в Черном море охватывает всю кислородную зону от супралиторали (донацилла [Шадрин, Афанасова, 2009], митилястер [Зайка и др., 1990], гастроподы [Чухчин, 1984]) до границ сероводородной зоны (фазеолина [Зайка и др., 1990]); они населяют все виды мягких и твердых субстратов, имеющих в море. Диапазон соленостной

толерантности таксоцена моллюсков в море чрезвычайно широк – от пресной воды до гиперсоленых условий 65–80‰ – *Cerastoderma glaucum* (Bruguère, 1789) в Бакальском озере (собственные наблюдения). Столь высокая солеустойчивость вида не удивляет, так как и в Арале *Cerastoderma* смогла адаптироваться к 80–90 ‰ [Андреев, Андреева, 2003]. Литература о диапазонах толерантности разных видов моллюсков обширна, поэтому здесь более этого касаться не будем. Отметим лишь, что в целом таксоцен моллюсков имеет чрезвычайно широкий диапазон толерантности к разным факторам, что обусловлено его видовым разнообразием.

В недалеком прошлом, несомненно, в Черном море основную роль среди двустворчатых моллюсков играли представители семейства Mytilidae. Даже обоснованно утверждалось, что «с точки зрения специалистов по бентосу, Черное море можно считать морем митилид» [Заика и др., 1990]. В последние годы, в связи с сокращением площадей, занятых поселением митилид [Терентьев, 2007; Стадниченко, Золотарев, 2009], и расширением ареалов с увеличением численности ряда видов-вселенцев, в первую очередь, это – анадара, мия, рапана, такое утверждение уже не выглядит обоснованным. Однако в целом моллюски продолжают играть в море существенную роль. Взрослые моллюски достигают высоких численностей/биомасс (до нескольких тысяч экз·м⁻² и более 46 кг·м⁻²) и играют существенную роль в донных экосистемах [Заика и др., 1990]. Планктонные личинки моллюсков временами могут быть доминирующим компонентом зоопланктона, превышая иногда 10 тыс. экз·м⁻³ [Заика и др., 1990].

Не касаясь важности моллюсков в трофических сетях морской экосистемы, отметим ряд моментов, обуславливающих их эдификаторную роль в море. В первую очередь, вероятно, надо вспомнить, что развитие донных микроводорослей и ряда групп мелких животных лимитируется наличием в море твердого субстрата. Суммарная площадь поверхностей раковин моллюсков в море огромна, что выражается в высоких показателях разнообразия, численности и биомассы эпибионтов (автотрофных и гетеротрофных), обитающих на их раковинах. Это, в частности, было показано на примере гидроидов, обитающих на мидиях [Гришичева, Шадрин, 1999]. Поселения моллюсков нередко являются ядрами сложнейших консорциев, включающих многие виды организмов [Заика и др., 1990; Гаевская и др., 1990; Гаевская, 2006 и др.]. Большое значение имеет и осветление придонного слоя воды плотными поселениями двустворчатых моллюсков-фильтраторов [Заика и др., 1990; Говорин, Курагин, 2011]. Подобные поселения, как и коллекторные популяции мидий, ведут к обогащению биогенами и органическими веществами донных отложений. Это, в свою очередь, с одной стороны, может создавать условия для существования ряда видов других таксонов, а с другой – вести к формированию восстановительных условий в донных осадках и над их поверхностью с дефицитом или полным отсутствием кислорода [Заика и др., 1990]. С помощью биссусных нитей или выделяемой ими слизи моллюски могут препятствовать размыву рыхлого грунта, скрепляя его [Тарасов и др., 1979]. И, наконец, раковинный материал моллюсков, выбрасываемый волнами на берег, может формировать пляжи, предохраняя коренной берег от размыва. Раковины моллюсков могут достигать более 50 % всех твердых частиц, формирующих пляж [Ивлиева, 2009 и др.]. При этом создается биотоп песчаного пляжа, населенный многими видами организмов, включая и двустворчатого моллюска *Donacilla cornea* [Шадрин, Афанасова, 2009]. Деградация поселений моллюсков в море –

Моллюски в меняющейся экосистеме Черного моря

уменьшение поступления раковинного материала на берег – одна из причин современного сокращения площадей пляжей на побережье Черного и Азовского морей [Ивлиева, 2009; Shadrin et al., 2012], что ведет и к большим экономическим потерям. Снижение площадей поселений двустворчатых моллюсков и их продуктивности в море может запускать самоускоряющийся механизм процессов размыва пляжа, что, в свою очередь, будет содействовать дальнейшей деградации поселений моллюсков в море [Shadrin et al., 2012]. При этом хищные брюхоногие моллюски, такие, например, как вселенец рапана, выедая поселения двустворчатых моллюсков, могут стать основной причиной, запускающей такой самоускоряющийся механизм. Усиление эрозии берега, вследствие, например, климатических причин или антропогенной деятельности, также может быть первопричиной деградации поселений моллюсков и включения механизма, упомянутого выше.

В условиях роста концентрации углекислого газа в атмосфере, вероятно, не следует упускать из виду и такую функцию моллюсков, как выведение CO_2 из биологического круговорота и захоронение его в виде CaCO_3 раковин.

1.2. Современные взгляды на динамику биологических/экологических систем

Необходимо кратко коснуться смены парадигм в понимании устойчивости и динамики систем, чтобы легче понять, что происходит с Черным морем и таксоценом моллюсков в нем.

Биологические/экологические системы всех уровней – от молекулярного до экосистемного, как и социальные системы, как правило, имеют не одно, а несколько устойчивых альтернативных состояний [Scheffer et al., 2009]. Это показано экспериментально, а также неизбежно следует и из общих положений теории диссипативных структур [Пригожин, Стенгерс, 2003] и синергетики [Хакен, 2003]. Осознание этого – суть новой парадигмы в биологии и экологии, взамен той, что рассматривает биологические/экологические системы как имеющие одну точку глобальной устойчивости, а все изменения системы – лишь флуктуации вокруг этой точки [Шадрин, 2012]. Данный момент необходимо учитывать, анализируя изменения любых биологических/экологических систем. Черное море, как и таксоценом моллюсков в нем, – не исключение.

Современные представления об устойчивости и динамике биологических, экологических и социальных систем, вероятно, наиболее четко выражены в концепции адаптивного цикла, предложенного видным экологом К.С. Холлингом. Ниже даны основные положения концепции [Holling, 2001; Walker et al., 2004]. Динамика системы описывается в виде цикла, известного как адаптационный цикл, где система проходит 4 стадии [Walker et al., 2004]. Две из них – фаза роста и эксплуатации – r (growth and exploitation) переходит в фазу сохранения – K (conservation phase) – являются медленной, кумулятивной направленной вперед петлей цикла. Это когерентная стадия, когда динамика происходит под контролем сложившейся устойчивой структуры экологического сообщества, в условиях острой конкуренции, и в этот период динамика системы корректно предсказуема. В продолжении фазы K ресурсы становятся все более и более труднодоступными, истощаются, и система прогрессирующе становится менее гибкой и отзывчивой на

Глава 1

внешние шоки. В конечном счете, неизбежно следует фаза хаотического коллапса и освобождения от взаимозависимостей – Ω (collapse and release phase), которая быстро ведет к фазе реорганизации – α (phase of reorganization). Фаза реорганизации может проходить быстро или медленно, в процессе ее создаются инновации, у системы появляются новые возможности. Фазы Ω и α вместе составляют непредсказуемую обратную петлю цикла – некогерентная стадия динамики в условиях разбалансированной структуры системы и ослабленной конкуренции элементов. Фаза α приводит к фазе γ , которая может походить на предыдущую фазу γ , а может очень сильно отличаться от нее. Как указывают авторы данной концепции [Walker et al., 2004], адаптационный цикл, в определенном смысле, – метафора, базирующаяся на наблюдаемых изменениях реальных систем, а не жестко фиксированное чередование фаз. Система может из состояния K возвращаться в γ , или из γ прямо в Ω , или из α обратно в Ω . Важно отметить, что это реализуется на различных масштабах, экосистемы существуют как панархии [Gunderson, Holling, 2002]. Панархия – набор динамичных систем, вложенных через различные масштабы друг в друга [Gunderson, Holling, 2002]. Взаимодействие процессов связывает их в целое сквозь все, как пространственные, так временные, шкалы. Примеры: один день полета поденок определяет в значительной мере их многолетнюю динамику; несколько часов сильного шторма могут обусловить годовую динамику эрозии берега и обмен поверхностных и глубинных вод; компактное место зимовки какого-либо вида сказывается на его численности на территории в порядки раз большей; микроэволюционные изменения в популяции ключевого вида, например, моллюска, могут полностью поменять структуру биотических связей в экосистеме, равно как и ее динамику и эволюцию. Важно понимать, что переход в состояние Ω – не крах системы, а открытие для нее новых возможностей [Holling, 2001; Walker et al., 2004]. И это надо учитывать как в экологических исследованиях, так и в социально – экологическом менеджменте.

Рассматривая динамику изменений, происходят ли они в экосистеме Черного моря или в отдельном моллюске, следует понять, с чем мы имеем дело – с когерентной стадией, когда динамика системы происходит в пределах одного устойчивого состояния (одной нормы реакции), или же мы имеем дело с транзитом в новое альтернативное устойчивое состояние. В период когерентной динамики изменения параметров системы происходят плавно и пропорционально изменению воздействующего фактора, а в некогерентную стадию – скачкообразно и непропорционально сильно в сравнении с изменением управляющего фактора. В зависимости от характера изменений необходимо по-разному проводить анализ и интерпретацию количественных данных, чтобы не обмануть себя кажущейся беспристрастной строгостью статистического анализа. Примером невдумчивого применения статистического анализа экспериментальных данных, ведущего к неоправданному выводу, может служить рисунок 1.1., взятый из одной экспериментальной работы. Как видно из распределения точек на рисунке, четко выделяются два состояния системы. Однако автор того исследования, проведя неадекватный статистический анализ данных, пришел к выводу о линейности взаимосвязи между значениями воздействующего фактора и откликающегося параметра и, как результат, получил прямую 1, аппроксимирующую зависимость в пределах всего изученного разброса фактора. Коэффициент корреляции при этом был достаточно высок и достоверен. В то же время из распределения точек явно

Моллюски в меняющейся экосистеме Черного моря

просматривается необходимость двух различных аппроксимирующих прямых (2 и 3), «перескок» с одной на другую происходит в интервале, где наблюдается повышенная изменчивость параметра-отклика. Следует отметить, что при переходе в стадию некогерентной динамики – в окрестностях точки невозврата/бифуркации – всегда происходит дестабилизация системы с ростом вариабельности ее параметров [Scheffer et al., 2009; Шадрин, 2012], в том числе и у моллюсков [Шадрин и др., 2005]. При этом может происходить не только переход в одно из ранее реализованных альтернативных устойчивых состояний, но и к инновации – созданию нового, то есть к эволюционному событию [Шадрин, 2009].

Рассматривая переходы на индивидуальном уровне, можно выделить два типа точек невозврата – точки переключения с одного креода развития на другой (онтогенетические) или с одного функционального состояния на другое (функциональные) [Шадрин, 2013]. В настоящее время уже есть ряд примеров того, как различные факторы, например соленость, влияют на выбор одного устойчивого состояния функционирования особи и популяции из множества возможных или одной из ряда возможных реализаций генотипа [Шадрин, 2013]. Альтернативность метаболических путей, которые могут использовать моллюски, – давно известный феномен [Горомосова, Шапиро, 1984].

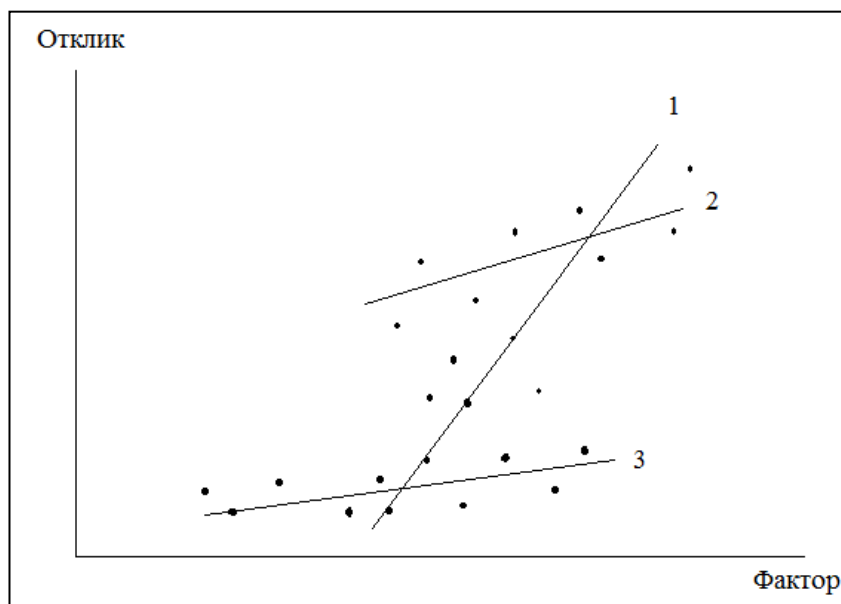


Рис. 1.1. Схематизированный пример неадекватной аппроксимации экспериментальных точек (прямая 1), когда наблюдается «перескок» с одной зависимости (прямая 3) на другую (прямая 2).

1.3. Изменения структуры таксоцены моллюсков: причины и последствия

Изменения видовой структуры (списка видов, соотношения численностей и биомасс) таксоцены моллюсков в Черном море происходят в различных его районах [Герентьев, 2007; Иванов, Синегуб, 2008; Мазлумян и др., 2009; Стадниченко,

Глава 1

Золотарев, 2009]. Причины этого различны, в частности, к ним относятся изменчивость гидрометеорологических условий, загрязнение среды, вселение экзотических видов, донное траление, гидротехнические сооружения и т.д. [Зайцев и др., 1993; Зайцев, 2006; Болтачев, 2006; Иванов, Синегуб, 2008 и др.]. Следует отметить, что часть гидрометеорологических флуктуаций является квазипериодическими, обуславливающими квазициклические колебания структуры таксоцена, что, например, показано на примере таксоцена моллюсков бухты Круглой [Шадрин и др., 2004]. Изменения видовой структуры таксоцена моллюсков обусловлены процессами, происходящими на различных уровнях организации – от глобально-биосферного до молекулярного. В первую очередь, они определяются на вышележащем уровне – в сообществе (трофические, топические и др. отношения), и нижележащем – в популяциях. Пытаясь связать в единое целое комплекс причин и следствий в изменениях таксоцена моллюсков, неизбежно приходишь к осознанию важной роли принципа панархии.

Изменения видовой структуры – доминирующего вида – может полностью изменять функциональную роль локального поселения моллюсков, в частности, в формировании пляжей. Пример – замена мидии вселенцем мией в акватории мыса Картказак (Каркинитский залив) [Шадрин, Сосновская, 2001], другие подобные примеры [Ивлиева, 2009]. Раковины умерших моллюсков-вселенцев остаются, как правило, в зоне продуцирования и не поступают на берег, что обусловлено их массивностью и экологией. Деграция поселений мидий/фацеолины, например, вследствие выедания их хищниками или заиления дна в результате донных тралений, ведет к уменьшению их кумулятивной фильтрационной способности, увеличению мутности воды, резкому изменению процессов седиментации взвеси [Говорин, Курагин, 2011]. Выше уже упоминался вклад изменений поселений моллюсков в деграцию берегов, пляжей – одной из острейших экологических проблем региона Черного моря. Примеров этого можно приводить много.

В настоящее время в Черном море происходит не только изменение видовой структуры таксоцена моллюсков, но меняется популяционная структура их массовых видов – размерная, половая, пространственная. Работ, посвященных этому, имеется уже довольно много, но обзор их не является нашей задачей. Отметим лишь одну из общих тенденций изменения размерно-возрастной структуры популяций у разных видов – уменьшение среднего возраста и размеров. К этому могут вести различные факторы. Например, загрязнение [Шадрин, Лежнев, 1990] в первую очередь, обусловлено тем, что устойчивость животных к неблагоприятным воздействиям часто уменьшается с возрастом – при стрессовых воздействиях с большей вероятностью гибнут более старшие особи [Шадрин, Лежнев, 1990]. Пресс хищников также нередко ведет к уменьшению средних размеров моллюсков в поселениях/популяциях. Так, например, установлено, что рапана, в первую очередь, выедает более крупных особей как в популяциях мидий [Говорин, Курагин, 2011], так и донацилл [Шадрин, Афанасова, 2009]. Повышение температуры среды также может вести к уменьшению размеров животных. Изменения в популяциях моллюсков не ограничиваются изменением их размерно-возрастной структуры. Под действием бытовых стоков, например, меняется структура энергетического баланса, что может вести, в частности, к уменьшению доли створок и гонад в общей массе тела у мидий, замедлению их полового созревания [Шадрин, Лежнев, 1990]. В результате загрязнения дестабилизируется

Моллюски в меняющейся экосистеме Черного моря

онтогенез, о чем свидетельствует, например, возрастание уровня флуктуирующей асимметрии у мидий из более загрязненных бухт [Shadrin et al., 1994]. Следует заметить, что у видов, вселившихся в новые местообитания, резко увеличивается изменчивость – дестабилизируется онтогенез, что, например, показано для анадары в Черном море [Шадрин и др., 2005] и *Syndosmya segmentum*, переселенной из Черного моря в Аральское [Андреев, Андреева, 2003]. Дестабилизация онтогенеза с ростом изменчивости может завершаться «перескоком» в новое устойчивое состояние, где особи и популяции вида будут проявлять новые, ранее для вида нехарактерные, особенности и свойства. Новые свойства могут проявляться на различных уровнях организации – от молекулярного до популяционного.

Популяционная структура и биотические связи разных видов моллюсков, их конкурентная способность, возможности отклика на изменения абиотических параметров, например, уменьшение концентрации кислорода, увеличение температуры среды, ацидификации и т.д., в значительной мере определяются их адаптационными потенциалами. Адаптационный потенциал любого вида складывается из двух типов/этапов отклика на изменения среды – физиологическая реакция в пределах одного устойчивого состояния функционирования и «переключение» в новое альтернативное состояние устойчивого функционирования, как правило, связанное с изменениями в экспрессии генов.

Рассматривая эколого-физиологические отклики того или иного вида моллюсков на любые изменения среды, следует учитывать оперативные отклики (поведенческие, физиологические) и процессы акклимации, которые проявляются на разных временных шкалах [Ивлева, 1981; Хлебович, 2012]. Как пример множественности взаимодополняющих и альтернативных механизмов биохимических адаптаций моллюсков, рассмотрен комплекс их адаптаций к гипоксии [Фокина и др., 2011].

Переходя с индивидуального уровня анализа адаптационного потенциала на популяционный, следует не забывать о разнообразии генотипов и фенотипов в популяциях [Wennersten, Forsman, 2012]. Из этого, в частности, следует, что в популяции разные особи могут использовать разные альтернативные пути адаптивного отклика на воздействующие факторы. Невозможно предсказать отклик популяции на изменение среды, не учитывая разнообразие особей в популяции по всем параметрам.

При резкой смене экологической обстановки, как правило, происходят изменения в биохимическом статусе особей. Изменения во внутренней среде организмов ведут к переключениям экспрессии генов, а нередко – и к увеличению частоты мутаций [Корочкин, 1999]. В конце 30-х годов было установлено, что у дрозофилы частота мутирования генов увеличивается как при повышении, так и при понижении температуры по сравнению с оптимальной. Исходя из этого, Ю. Я. Керкис [1940] предложил «физиологическую концепцию» мутагенеза, впоследствии развитую М. Е. Лобашевым [1947]. Эта концепция основывалась на допущении, что спонтанные мутации возникают в результате физиологических и биохимических процессов в клетках и отражают степень неупорядоченности этих процессов. Возрастание неупорядоченности, сопровождающее отклонение условий обитания от комфортных, должно усиливать спонтанный мутагенез и вариабельность экспрессии генов [Корогодин и др., 1990]. Вследствие этого нарастает изменчивость, повышается разнообразие особей в популяции [Шадрин,

2009]. При этом моллюски могут распространяться в новые адаптивные зоны, расширяя свой биотоп, экологию и тип питания. Это, например, показано для двустворчатых моллюсков рода *Cerastoderma* в условиях осолоняющегося Аральского моря при исчезновении других видов двустворчатых моллюсков [Андреев, Андреева, 2003]. Изменения в прибрежных акваториях Крыма, как показывают отложения, не раз приводили к относительно быстрым морфологическим изменениям и росту разнообразия форм у моллюсков рода *Cerastoderma*, что впервые для Черного моря показано Д.М. Раузнер-Черноусовой [Раузнер-Черноусова, 1928], а сейчас прослеживается в Аральском море [Андреев, Андреева, 2003]. Не вызывает сомнения, что появляющиеся морфологические различия всегда являются результатом изменчивости молекулярно-клеточных и физиологических процессов. Морфологические преобразования, в свою очередь, индуцируют определенные изменения в процессах метаболизма, обеспечивающих существование моллюсков в изменившейся и меняющейся среде.

Катастрофические изменения среды, как это показано, например, для двустворчатых моллюсков Аральского моря, могут вести к сравнительно быстрым эволюционным изменениям [Андреев, Андреева, 2003], которые невозможно объяснить полностью в рамках Синтетической теории эволюции [Шадрин, 2009]. В эволюционных, как и в экологических, процессах организм не является пассивным объектом внешних воздействий, он всегда активно реагирует на них. Прогнозируя долговременный отклик популяций моллюсков в меняющемся Черном море, нельзя исключать возможность их относительно быстрых эволюционных преобразований, то есть появления новых свойств и качеств. Разумеется, все они будут базироваться на некоторых биохимических новациях. Исходя из этого, следует особое внимание обращать на результаты опытов и анализов, которые нетипичны, резко отличаются от ожидаемых. Средние значения помогают понять функционирование организмов в пределах одного устойчивого состояния, а уклоняющиеся от среднего данные – предсказать возможность и вероятное направление «перескока» в альтернативное устойчивое состояние или возникновение эволюционных новаций. Эволюционные новации в определенных рамках предсказуемы, так как возможность их заложена в генотипе – ряды гомологической изменчивости Н.И. Вавилова [1922, цит. по Вавилов, 1967]. Следовательно, желая предсказать возможные эволюционные сдвиги в популяциях того или иного вида, надо смотреть не только на изменчивость интересующего вида, но и на изменчивость близкородственных видов. Следует при этом помнить, что такая канализированность изменчивости не подменяет действие отбора, а лишь задает границы возможного материала для отбора [Трапезов, 2007].

Эволюционные преобразования одного вида могут кардинально повлиять на функционирование всей водной экосистемы. Теоретически это допускалось давно, но сейчас уже это допущение доказано на примере экосистем озер, где в результате быстрых эволюционных преобразований одного вида рыб изменились и параметры функционирования экосистемы в целом [Walsh et al., 2012].

В настоящее время наука не может предсказывать возможные траектории изменений экосистем или их компонент – моллюсков в нашем случае. В частности, и потому, что мы еще далеки от понимания роли отдельных метаболических откликов на изменения параметров внешней среды в динамике надклеточных систем. Последующие главы монографии будут, в основном, посвящены

Моллюски в меняющейся экосистеме Черного моря

некоторым механизмам обеспечения метаболизма на клеточном и тканевом уровнях, участвующим в эколого-физиологических откликах моллюсков. Без этого невозможно понимание изменений таксоцена моллюсков, происходящих в меняющейся экосистеме Черного моря.

Глава 2

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС ТКАНЕЙ ЧЕРНОМОРСКИХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

В настоящей главе представлена информация об особенностях организации антиоксидантного ферментного комплекса в тканях трех наиболее массовых видов двустворчатых моллюсков Черного моря – аборигенного вида *Mytilus galoprovincialis* Lam., вселенца *Anadara inaequalvis* Br. и интродуцента *Crassostrea gigas* Thunberg.

2.1. Сравнительная характеристика АО комплекса и процессов ПОЛ у моллюсков и других организмов

Состояние антиоксидантного (АО) комплекса и уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях двустворчатых моллюсков взаимосвязаны с особенностями их жизнедеятельности. Высокая фильтрационная активность и постоянный контакт с многочисленными растворенными в воде веществами, вероятно, способствовали формированию у данной группы организмов в ходе эволюционного процесса эффективного АО комплекса и сбалансированного соотношения его активности с уровнем ПОЛ в тканях.

2.1.1. Процессы ПОЛ

Содержание продуктов ПОЛ у моллюсков выше по сравнению с животными других таксонов: ракообразными, иглокожими, рыбами – до 25 раз [Livingstone et al., 1993; Livingstone et al., 1995; Овечкина и др., 2001; Александрова и др., 2001; Porte et al., 2002; Довженко, 2006; Amado et al., 2006], млекопитающими – до 200-300 раз [Livingstone et al., 1992; Livingstone et al., 1993; Porte et al., 2001; Долматова и др., 2004; Джазаэрли, Давыдов, 2006; Soldatov et al., 2007]. Результаты наших определений интенсивности ПОЛ в разных тканях мидии, анадары, устрицы также подтверждают этот факт [Гостюхина и др., 2005; Гостюхина, Головина, 2010; Гостюхина и др., 2010; Головина и др., 2011].

Высокие показатели ПОЛ у двустворчатых моллюсков, очевидно, связаны с особенностями течения метаболических процессов в их тканях.

У этих животных в составе клеточных мембран отмечается сравнительно низкое содержания поли- (ПНЖК) и мононенасыщенных (МНЖК) жирных кислот (ЖК) в сравнении с другими организмами [Livingstone et al., 1993; Livingstone et al., 2000; Shulman et al., 2002]. Однако среди них явно доминируют докозогексаеновая 22:6n-3, эйкозопентаеновая 20:5n-3, арахидоновая 20:4n-6 и линолевая 18:2n-6, а также кислоты 18:1n-9, 18:1n-7 и др. [Ribera et al., 1989; Владимирова, 2004]. Именно эти ЖК являются преимущественными субстратами ПОЛ, окисляемыми в первую очередь. Показано, что из этих видов ЖК в процессе свободно-радикального

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

окисления (СРО) формируются многочисленные продукты ПОЛ – малоновый диальдегид (МДА) (из ЖК 20:4, 20:5, 22:6), алкенали, алкадиенали и их производные (из ЖК 18:2, 20:4, 20:5, 22:6), перекиси липидов и др. [Кернична, 2006; Лукьянова и др., 1982; Pan et al., 2009]. Наиболее предрасположены к ПОЛ фосфолипиды мембран, имеющие большее соотношение ПНЖК/МНЖК, что более характерно для моллюсков по сравнению с другими группами организмов [Porte et al., 2001].

Процессы, протекающие в электронтранспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий моллюсков, отличаются повышенной интенсивностью в связи с необходимостью нейтрализации большого числа ксенобиотиков [Livingstone et al., 2000; Livingstone, 2001]. Как известно, при работе ЭТЦ образуется ряд активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) [Livingstone, 2001, Lionetto et al., 2003], а также недоокисленные продукты трансформации поллютантов [Livingstone et al., 2000; Livingstone, 2001], что также должно способствовать усилению процессов ПОЛ.

Ткани моллюсков характеризуются высокоэффективными процессами микросомального окисления в ходе НАД(Ф)Н-зависимой генерации H_2O_2 при биотрансформации и детоксикации различных соединений [Regoli, Principato, 1995; Livingstone et al. 2000; Livingstone, 2001; Александрова и др., 2001; Funes et al., 2006]. Это также можно рассматривать как одну из причин роста интенсивности процессов ПОЛ в тканях данных животных.

Моллюски отличаются высоким уровнем собственной эндогенной фермент-зависимой продукции АФК с участием НАД(Ф)Н-цитохром-*c*-редуктазы, ксантиноксидазы, гликолат- и альдегидоксидазы и других ферментов [Livingstone et al., 2000], что связано с регуляторными и защитными свойствами многих АФК и АФА [Ribera et al., 1991; Livingstone et al., 2000; Livingstone, 2001]. Так, выявлена важнейшая роль АФК и АФА в формировании иммунных реакций, в развитии воспаления, запуске апоптоза, активации многих ферментов и их комплексов [Wenning, Di Giulio, 1988; Гордеева, Лабас, 2003]. Монооксид азота (NO) и его метаболиты также имеют антиоксидантные и цитопротекторные свойства [Lionetto et al., 2003]. Предполагается и наличие возможного перекрестного АО эффекта NO и супероксиданионрадикала ($COAP, O_2^{\cdot-}$) [Ribera et al., 1991]. АФК и АФА в низких концентрациях могут индуцировать экспрессию генов [Wenning, Di Giulio, 1988; Оксененко, 2005]. Этот далеко не полный перечень процессов с участием активных форм кислорода и азота отражает их чрезвычайно важную роль как регуляторных и сигнальных молекул, управляющих жизнью клетки.

Среди прочих ксенобиотиков в организм моллюсков могут поступать соединения, вовлекаемые в редокс-циклы (ионов Cu, Fe и др.), что также сопряжено с усилением генерации АФК и АФА [Livingstone et al., 2000; Livingstone, 2001; Lionetto et al., 2003]. Например, при метаболизме пестицида параквата и других подобных веществ образуются их производные, которые в присутствии кислорода вновь быстро окисляются до исходной формы с образованием $COAP$ и других АФК, что снова активизирует СРО [Livingstone, 2001; Funes et al., 2006].

У двустворчатых моллюсков выявлен особый механизм спонтанной генерации АФК, контролируемый НАДФН-оксидазами [Gamble et al., 1995]. Он является одним из активных источников АФК в клетке и также должен способствовать росту ПОЛ в тканях этих животных [Livingstone, 2001].

Глава 2

2.1.2. АО ферментный комплекс

Для защиты клеток от негативного действия АФК и АФА у двустворчатых моллюсков сформировался АО комплекс, показатели которого выше, чем у организмов других таксонов, и имеют качественные отличия.

Анализ литературных источников показывает, что активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) у двустворчатых моллюсков значительно выше, чем у ракообразных, иглокожих [Руднева-Титова, 1996; Doyotte et al., 1997; Cheung et al., 2001; Pavlović et al., 2010], рыб [Livingstone, 1993; Овечкина и др., 2001; Довженко, 2006; Коваль и др., 2006; Lemaire, Pavlović et al., 2010] и млекопитающих [Cossu et al., 1997; Livingstone et al. 2000; Cheung et al., 2001; Долматова и др., 2004]. Ткани моллюсков отличаются и высоким ресурсом восстановленного глутатиона (GSH) по сравнению с рыбами [Lemaire, Livingstone, 1993] и млекопитающими [Livingstone et al., 1993; Челомин и др., 1998; Cheung et al., 2001; Долматова и др., 2004; Солдатов и др., 2008].

Подтверждением высокой эффективности АО комплекса моллюсков может служить отсутствие некоторых АО ферментов у организмов других таксонов. Например, у ряда микроорганизмов, растений, беспозвоночных отсутствует ГП [Livingstone et al., 2000], а у акул – каталаза [Sen, Semiz, 2007]. В то же время каталаза присутствует в организме нижестоящих на филогенетической лестнице видов червей, ракообразных, моллюсков. Поэтому утрата хрящевыми рыбами каталазы рассматривается как прямое свидетельство несовершенства их АО системы [Sen, Semiz, 2007]. Сравнение величин активности каталазы и ГП показывает, что большинство морских моллюсков имеет повышенную активность этих ферментов [Кения и др., 1993; Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 2000; Cheung et al., 2001; Джазаэрли, Давыдов, 2006; Солдатов и др., 2008]. Так, активность каталазы у моллюсков многократно выше, чем у морских звезд, ракообразных [Челомин и др., 1998; Довженко, 2006; Pavlović et al, 2010], голотурий [Руднева-Титова, 1996; Pavlović et al, 2010], рыб [Zhang et al., 2004; Лукьянова, 2006; Pavlović et al, 2010; Истомина-2011], млекопитающих [Livingston et al., 1992; Dickinson, Forman, 2002; Джазаэрли, Давыдов, 2006; Pavlović et al, 2010].

Среди АО показателей не составила исключения и супероксиддисмутаза (СОД), активность которой у моллюсков рода *Mytilus* выше, чем у других гидробионтов: гребешка, ракообразных, иглокожих [Pavlović et al, 2010]. При анализе работ ряда авторов находим более высокую активность СОД у мидий по сравнению с рыбами [Lemaire, Livingstone, 1993; Doyotte et al., 1997], различия между моллюсками и млекопитающими еще больше – до 2-3 порядков [Livingston et al., 1992; Челомин и др., 1998; Porte et al., 2001; Овечкина и др., 2001; Долматова и др., 2004; Довженко, 2006; Pavlović et al, 2010]. Установлена обратно пропорциональная зависимость между активностью СОД и филогенетическим положением организма в ряду «рыбы-амфибии-рептилии-млекопитающие» [Wu et al., 2007]. Уменьшение активности СОД с ростом уровня эволюционной организации авторы связывают со снижением интенсивности СРО, что, в свою очередь, обусловлено возрастанием индекса насыщенности жирных кислот в липидах биомембран.

По нашим данным, характеристики АО системы (активность каталазы, СОД, ГП, ГР и содержание GSH) имеют тканевую и видовую специфику,

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

значительно зависят от естественной подвижности животных и стадии зрелости гонад, что необходимо учитывать при сравнении таксономически удаленных видов [Гостюхина и др., 2005, Гостюхина и др., 2010, Гостюхина, Головина, 2010, Головина и др., 2011]. Если во всех исследованных тканях мидии, анадары и устрицы активность ГР была в 40-100 раз выше, чем у камбалы-калкан, то уровень остальных показателей у моллюсков и камбалы был близок.

Рассматривая результаты исследований ряда авторов, можно сделать вывод, о том, что двустворчатые моллюски обладают также более высокой активностью ферментов биотрансформации, работа которых сопряжена с АО комплексом, – глутатионтрансферазы (ГТ), DT-диафоразы, цитохромов P-450, этоксирезорурфин O-деэтилазы, металлотионеинов и других [Кения и др., 1993; Руднева-Титова, 1997; Livingstone et al. 2000; Livingstone, 2001; Солдатов и др., 2007]. Эти ферменты способствуют защите АО комплекса от окислительной деструкции при обезвреживании ксенобиотиков [Winston, Di Giulio, 1991; Regoli, Principato, 1995; Livingstone et al. 2000; Livingstone, 2001; Лукьянова, 2006].

Морские двустворчатые моллюски отличаются и большим, чем у некоторых морских рыб, содержанием неферментативных низкомолекулярных веществ, проявляющих АО свойства: каротиноидов, витаминов, аминокислот и др. [Holland, Brown, 1993].

Существует функциональная связь каротиноидов с другими АО компонентами. В наших исследованиях на черноморской мидии показано, что низкий уровень каротиноидов у особей с депигментированными тканями сопровождался и значительным снижением АО потенциала тканей – активности СОД, каталазы, пероксидазы и уровня GSH [Солдатов и др., 2003; Гостюхина и др., 2012], что отражает важную роль каротиноидов в механизмах АО защиты моллюсков.

Таким образом, анализ приведенной информации позволяет заключить, что ткани двустворчатых моллюсков отличаются повышенным уровнем ПОЛ по сравнению с животными других таксонов. Наибольшие различия имеют самые далекие в эволюционном отношении группы – моллюски и млекопитающие, в то время как между гидробионтами отличия меньше. В отношении АО комплекса информация не столь однозначна. В сравнительных исследованиях необходимо учитывать тканевую специфику активности ферментов, эколого-физиологические особенности вида (период годового цикла, стадию зрелости гонад, подвижность животных и др.).

2.2. АО ферментный комплекс тканей *M. galloprovincialis*

Mytilus galloprovincialis Lam. – типичный представитель двустворчатых моллюсков в черноморском регионе. Образует значительные скопления в прибрежных акваториях Крыма. Многие исследователи отмечают неоднородность популяционной структуры данного вида, выделяя донные и скальные группировки, внешним проявлением которых является цвет раковины [Иванов и др., 1989]. Считается, что этот признак генетически детерминирован, о чем свидетельствуют результаты гибридологического анализа, исследование изоферментного спектра неспецифических эстераз и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы [Булатов, 1984;

Пиркова и др., 2000]. Однако этот вывод оспаривается в серии публикаций [Newkirk, 1980; Казанкова, 2010]. Вместе с тем отмечается, что между скальными и донными группировками моллюска существует ряд функциональных отличий в скорости соматического роста, а также в скорости образования и прочности биссусных нитей и т.д. [Иванов и др., 1989].

Выделяют две основные цветотипы (морфы) – черную (черно-фиолетовую), коричневую и ряд промежуточных форм [Булатов, 1954; Иванов и др., 1989]. Мидии черной морфы имеют черно-фиолетовую окраску створок раковины, темно-фиолетовый, почти черный мантийный край, темно-коричневую ногу и хорошо развитую окраску внутренних органов (темный зелено-коричневый гепатопанкреас, розовато-бежевые жабры) (рис. 2.1).

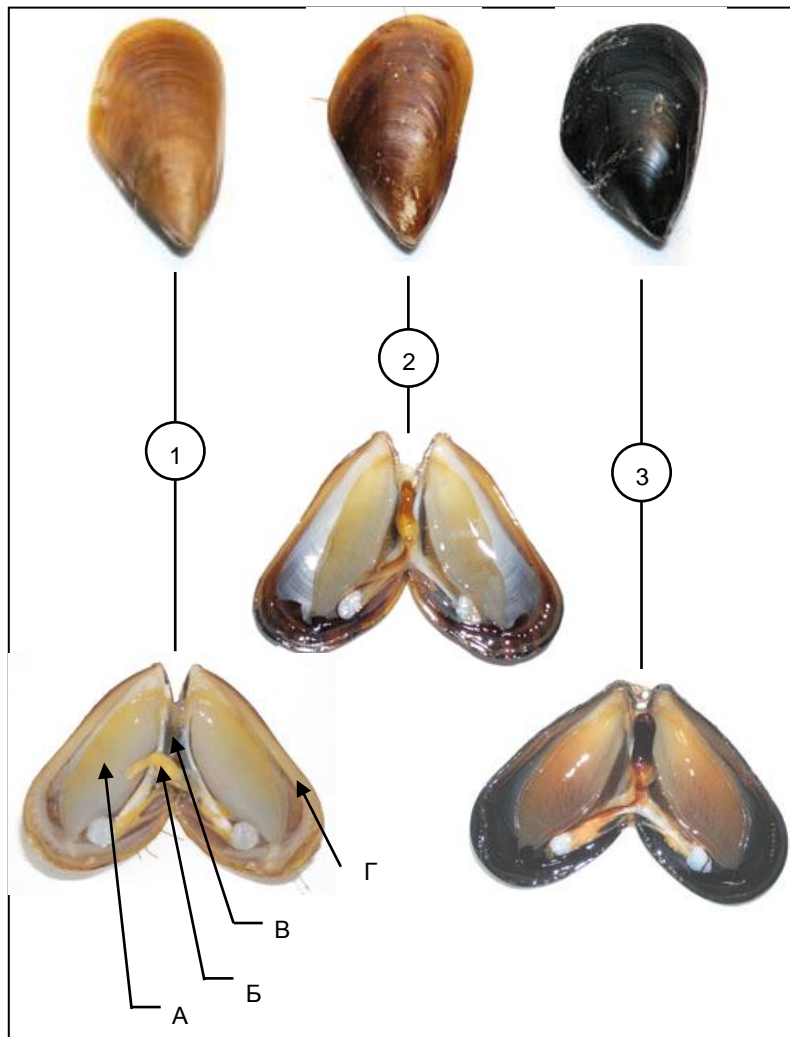


Рис. 2.1. Внешний вид раковин и мягких тканей мидии *M. galloprovincialis* Lam. (1 – мидии с депигментированными тканями, 2 – коричневая морфа, 3 - черная морфа, А – жабры, Б – нога, В – гепатопанкреас, Г – мантийный край)

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

Раковина мидий коричневой морфы имеет желто-коричневую окраску (совершенно лишенную синего пигмента) нескольких оттенков – от светло- до темно-коричневых тонов [Иванов и др., 1989]. На раковине отдельных особей присутствуют темные полосы, расположенные в продольном направлении. Мягкие ткани мидий данной группы так же, как и у черных особей, имеют хорошо выраженную окраску (темно-коричневые мантийный край и нога, темный зеленовато-коричневый гепатопанкреас, розовато-бежевые жабры) (рис. 2.1). Мидии черной морфы обитают преимущественно в прибойной зоне на твердых субстратах (скаловая форма). Коричневые особи приурочены к донным ландшафтам [Иванов и др., 1989; Заика и др., 1990]. Условия существования в указанных экотопах отличаются по ряду параметров, в том числе и по степени насыщения воды кислородом, что может сказываться на уровне окислительной нагрузки в тканях моллюсков.

В естественных скоплениях *Mytilus galloprovincialis* крайне редко встречаются особи с депигментированными тканевыми структурами (далее ДТ). На них приходится не более 1-2 % особей. Они характеризуются наличием мантийного края и ноги молочно-белого цвета, слабо окрашенных жабр (бледно-бежевая окраска) и гепатопанкреаса (светло-коричневая окраска) (рис. 2.1). Цвет раковины – светло-коричневый. Впервые популяционно-генетические особенности этой морфы были исследованы А.В. Пирковой с соавторами [Пиркова и др., 2000].

При исследовании АО ферментного комплекса и процессов ПОЛ в тканях *M. galloprovincialis* мы учитывали особенности цветового полиморфизма раковины моллюска. В работе использовали взрослых особей обоего пола одного срока оседания с длиной раковины 50-60 мм.

2.2.1. Черная морфа

Жабры. Содержание ТБК-активных продуктов у особей черной морфы в этом органе было наибольшим. В сравнении с гепатопанкреасом и ногой различия составили 1,6 ($p \leq 0,01$) и 2,2 ($p \leq 0,001$) раза (табл. 2.1), то есть уровень окислительных процессов в жабрах был максимальным [Гостюхина, 2008].

Таблица 2.1

Содержание ТБК-активных продуктов в тканях мидий разных групп, мкмоль МДА·мг⁻¹ белка

Ткани	Группа моллюсков					
	Черные		Коричневые		ДТ	
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
ГЕП	19	883,1±59,0*	15	1123,2±223,0	9	1520,3±148,3*
Жабры	19	1446,3±133,9**	14	1412,2±234,2	10	2819,3±260,7**
Нога	15	648,9±134,1	9	632,6±180,6	12	607,3±102,5

Примечание: ГЕП – гепатопанкреас; n – число особей; отличия достоверны между морфами: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$

Глава 2

Окислительная нагрузка в основном компенсировалась за счет глутатионовой системы (ГС: ГП, ГР, GSH), поскольку на фоне низкого содержания GSH ($154,8 \pm 18,4$ мкг·г⁻¹ ткани) у моллюска установлена максимальная активность ГР ($139,9 \pm 17,9$ мкмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) и ГП ($40,5 \pm 3,9$ мкмоль GSSG·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) (рис. 2.2, 2.3). Активность ГР в жабрах по сравнению с гепатопанкреасом и ногой была в 1,7 ($p \leq 0,05$) и 3,2 раза ($p \leq 0,001$) выше, а содержание GSH – в 2,5 раза ниже ($p \leq 0,001$), чем в гепатопанкреасе (рис. 2.3). Такое соотношение процессов свидетельствует об активном использовании ресурса GSH в АО защите [Гостюхина, 2008].

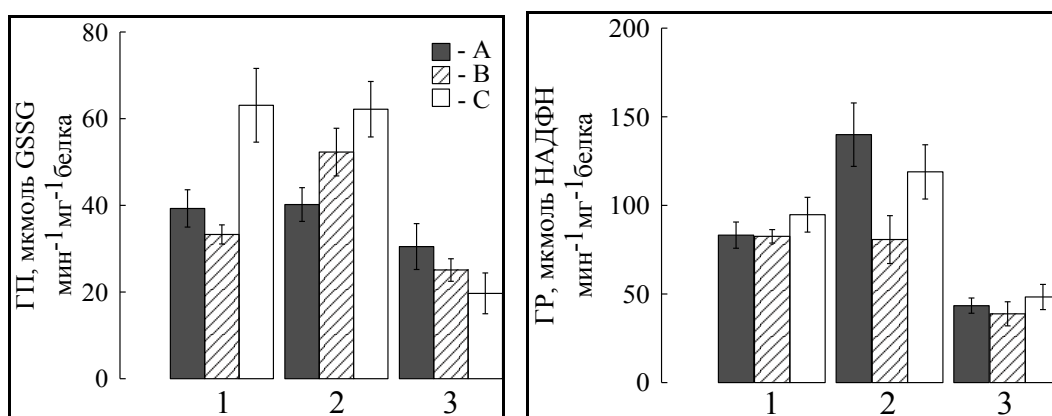


Рис. 2.2 Тканевая специфика активности ГП и ГР у мидий разных групп (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – черная морфа, В – коричневая морфа, С – мидии с ДТ)

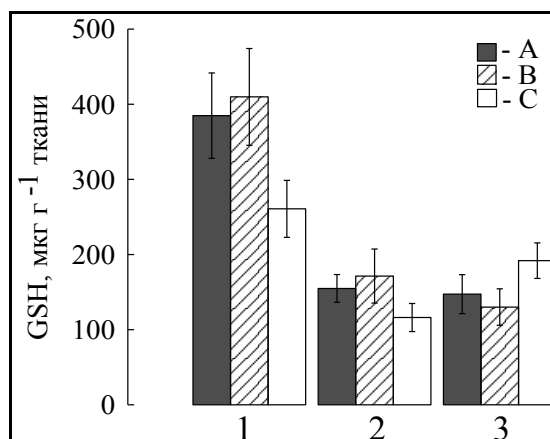


Рис. 2.3 Тканевая специфика содержания GSH в тканях мидий разных групп (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – черная морфа, В – коричневая морфа, С – мидии с ДТ)

Роль остальных ферментов (СОД, каталазы и пероксидазы) в АО защите жаберной ткани, по-видимому, была менее существенной. Активность каталазы составила $417,4 \pm 44,3$, а пероксидазы – $5,5 \pm 0,59$ мкмоль H_2O_2 ·мин⁻¹·мг⁻¹ белка. В сравнении с гепатопанкреасом данные значения были соответственно в 3,2

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

($p \leq 0,001$) и 1,7 раза ($p \leq 0,05$) ниже (рис. 2.4, 2.5). Активность СОД составляла $2038,9 \pm 221,5$ мкмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что было в 4,2 раза ниже чем в ноге, где зарегистрированы наибольшие значения ($p \leq 0,001$) (рис. 2.4) [Гостюхина, 2008].

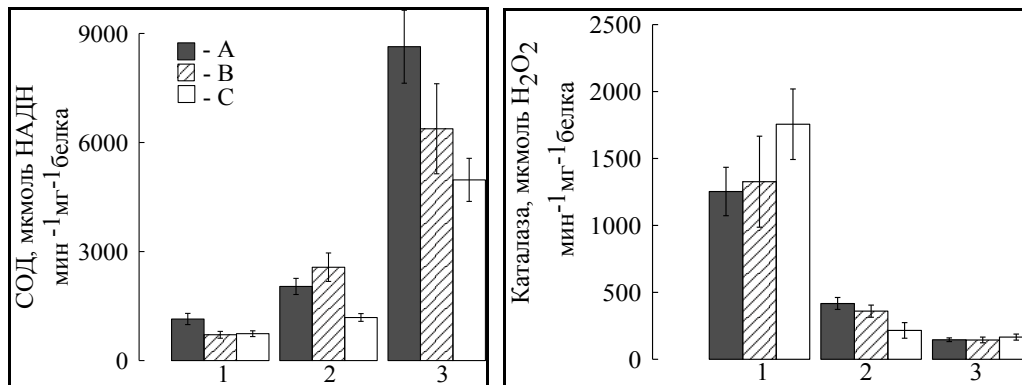


Рис. 2.4. Тканевая специфика активности СОД и каталазы у мидий разных групп (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – черная морфа, В – коричневая морфа, С – мидии с ДТ)

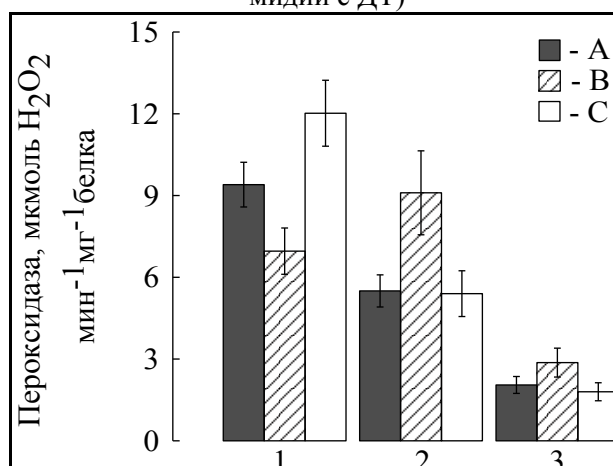


Рис. 2.5 Тканевая специфика активности пероксидазы у мидий разных групп (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – черная морфа, В – коричневая морфа, С – мидии с ДТ)

Гепатопанкреас. В гепатопанкреасе мидий черной морфы отмечали высокую активность каталазы ($1327,1 \pm 180,9$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг белка⁻¹) и пероксидазы ($9,4 \pm 0,82$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) (рис. 2.4, 2.5). Эти величины в 1,7-3,2 раза ($p \leq 0,05-0,01$) превышали значения, отмеченные для жабр, и в 4,5–9,0 раз ($p \leq 0,001$), полученные для ноги моллюска [Гостюхина и др., 2005; Гостюхина, 2008]. При этом активность СОД была невысокой, а содержание ТБК-активных продуктов не превышало значений, зарегистрированных для жабр (табл. 2.1).

Участие ГС в нейтрализации продуктов ПОЛ и формировании адаптивного ответа имело менее существенное значение, чем в жабрах. Об этом свидетельствовало высокое содержание GSH ($384,8 \pm 56,8$ мкг·г⁻¹ ткани) на фоне повышенной активности ГР ($83,2 \pm 7,4$ мкмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) и ГП

($39,3 \pm 4,3$ мкмоль GSSG·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) (рис. 2.2, 2.3) [Soldatov et al., 2007; Гостюхина, 2008].

Нога. Для системы АО защиты ткани ноги моллюсков черной морфы была характерна высокая активность СОД – $8634,1 \pm 1003,8$ мкмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка. В сравнении с жабрами и гепатопанкреасом различия достигали 4,2 и 7,6 раза ($p \leq 0,001$) соответственно (рис. 2.4). Содержание GSH в ноге фактически не отличалось от других тканей (рис. 2.3). При этом активность каталазы, пероксидазы, ГР, ГП и уровень ТБК-активных продуктов имели наименьшие значения (рис. 2.2, 2.4, 2.5; табл. 2.1) [Soldatov et al., 2007; Гостюхина, 2008].

2.2.2. Коричневая морфа

Жабры. Аналогично мидиям черной морфы в жабрах моллюсков с коричневой окраской раковины обнаружено наибольшее содержание ТБК-активных продуктов – $1412,2 \pm 223,0$ мкмоль МДА·мг⁻¹ белка. Данная величина была в 1,3 и 2,2 раза выше ($p \leq 0,05$), чем в гепатопанкреасе и ноге соответственно (табл. 2.1).

Существенная роль в реакциях АО защиты принадлежала ГС. Свидетельством этого явились максимальные активности ГП – $52,3 \pm 5,5$ мкмоль GSSG·мин⁻¹·мг⁻¹ белка и ГР – $80,7 \pm 13,5$ мкмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.2) на фоне сравнительно низкого содержания GSH ($171,2 \pm 36,0$ мкг·г⁻¹ ткани) (рис. 2.3). В сравнении с остальными тканями активность ГП в жабрах была в 1,6-2,1 раза выше ($p \leq 0,05-0,01$). В активности ГР отличия обнаружены только по отношению к ткани ноги, они составили 2,0 раза ($p \leq 0,01$) (рис. 2.2).

Наряду с ГС, вклад в компенсацию окислительной нагрузки в ткани жабр вносила и пероксидаза, активность которой составила $9,1 \pm 1,54$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка. В сравнении с гепатопанкреасом и ногой различия составили 1,3 раза ($p \leq 0,05$) и 3,2 раза ($p \leq 0,001$) (рис. 2.5). По величинам активности СОД и каталазы жаберная ткань занимала промежуточное положение [Гостюхина, 2008].

Гепатопанкреас. Значительная роль в противодействии окислительной нагрузке в гепатопанкреасе мидий коричневой морфы, как и у особей черной морфы, принадлежала каталазе. Активность фермента составляла $1369,9 \pm 103,5$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что соответственно в 3,8 и 9,5 раза выше ($p \leq 0,001$), чем в жабрах и ноге (рис. 2.4). В отличие от каталазы, активность сопряженной с ней СОД была минимальна – $708,2 \pm 94,5$ мкмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.4).

Характерной особенностью АО комплекса гепатопанкреаса было также максимальное содержание GSH – $409,7$ мкг·г⁻¹ ткани, что в 2,4 раза ($p \leq 0,01$) выше, чем в жабрах, и в 3,2 раза ($p \leq 0,001$) – чем в ноге (рис. 2.3). На этом фоне обнаружен сравнительно высокий уровень активности GSH-зависимых ферментов: ГП – $33,3 \pm 2,2$ мкмоль GSSG·мин⁻¹·мг⁻¹ белка и ГР – $82,5 \pm 3,8$ мкмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.2) [Гостюхина, 2005; Soldatov et al., 2007; Гостюхина, 2008].

Нога. Отличительной чертой АО системы ноги особей с коричневой раковиной, так же как и у моллюсков черной морфы, является высокая активность СОД. Ее величина составила $6376,3 \pm 1239,8$ мкмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка и превышала таковые в жабрах и гепатопанкреасе в 2,5 ($p \leq 0,001$) и 9,0 ($p \leq 0,001$) раз соответственно (рис. 2.4). Активность остальных ферментов (рис. 2.2, 2.4, 2.5) и уровень ТБК-активных продуктов были минимальны (табл. 2.1) [Гостюхина, 2008].

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

2.2.3. Моллюски с депигментированными тканями

Жабры. Уровень ТБК-активных продуктов в жабрах мидий с ДТ, как и у типично окрашенных мидий, был максимальным и превышал аналогичные значения, полученные для гепатопанкреаса и ноги соответственно в 1,9 ($p \leq 0,001$) и 4,6 раза ($p \leq 0,001$) (табл. 2.1).

На фоне высокой интенсивности процессов ПОЛ в жабрах мидий с ДТ обнаружен минимальный уровень GSH, который был в 2,2 ($p \leq 0,01$) и 1,7 раза ($p \leq 0,05$) ниже, чем в гепатопанкреасе и ноге, соответственно (рис. 2.3). При этом данная ткань характеризовалась максимальной активностью ферментов ГС. Достоверные отличия в активности ГП и ГР обнаружены только в сравнении с тканью ноги, они составили соответственно 2,5 ($p \leq 0,001$) и 3,2 раза ($p \leq 0,001$) (рис. 2.2). Величины активности СОД, каталазы и пероксидазы в ткани жабр занимали промежуточное положение в сравнении с остальными тканями моллюска (рис. 2.4, 2.5), что свидетельствовало о невысоком вкладе этих ферментов в нейтрализацию окислительной нагрузки [Солдатов и др., 2003; Гостюхина, 2008].

Гепатопанкреас. У мидий с ДТ большинство характеристик АО комплекса имело максимальные значения. Активность каталазы и пероксидазы превосходила соответствующие значения в жабрах и ноге в 8,1-10,5 раз ($p \leq 0,001$) и в 2,2-7,0 раз ($p \leq 0,001$) (рис. 2.4, 2.5). Активность ГП и ГР была достоверно выше, чем в ноге в 3,2 ($p \leq 0,001$) и 2,0 раза ($p \leq 0,01$) соответственно (рис. 2.2). Отмечен наиболее высокий ресурс GSH в ткани, что в 2,2 раза ($p \leq 0,01$) превышало значения, отмеченные для жабр (рис. 2.3).

Нога. АО комплекс ноги у мидий с ДТ характеризовался максимальной активностью СОД, которая была выше, чем в гепатопанкреасе и жабрах в 6,7 и 4,2 раза ($p \leq 0,001$) соответственно (рис. 2.4). На этом фоне активность всех остальных ферментов, а также содержание ТБК-активных продуктов имели минимальные значения (рис. 2.2, 2.4, 2.5, табл. 2.1). Уровень GSH был близок к отмеченному в гепатопанкреасе и в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) превышал величины, полученные для жабр (рис. 2.3) [Солдатов и др., 2003; Гостюхина, 2008].

Таким образом, тканевая специфика организации АО ферментного комплекса у моллюсков различных цветовых морф была близкой.

- Жабры подвергались наиболее высокой окислительной нагрузке, о чем свидетельствовало повышенное содержание ТБК-активных продуктов в ткани.
- Окислительная нагрузка в жаберной ткани моллюсков компенсировалась преимущественно за счет ферментов высокого сродства к субстрату. Об этом свидетельствовал высокий оборот GSH в этом органе: низкое содержание GSH сочеталось с высокими активностями ГР и ГП.
- АО ферментный комплекс гепатопанкреаса мидий был ориентирован преимущественно на нейтрализацию гидроперекисей. В нем обнаружены самые высокие активности каталазы и пероксидазы, которые в ряде случаев (коричневая морфа, моллюски с ДТ) дополнялись повышенной активностью ГП и ГР. Активность СОД при этом была наименьшей.
- В ноге моллюска отмечали высокую активность СОД при минимальных значениях активности каталазы. Это позволяет говорить о том, что в данном органе скорее происходит генерация СОАР, а не его нейтрализация.

2.2.4. Возможные причины, определяющие тканевую специфику АО ферментного комплекса мидий

Жабры. Наибольший уровень ТБК-активных продуктов в жабрах моллюсков трех групп указывает на максимальную интенсивность окислительных процессов в данном органе. Исследователи отмечают повышенный уровень продуктов ПОЛ в жабрах моллюсков разных видов: *M. galloprovincialis* [Regoli, Principato, 1995; Gorinstein et al., 2003], *M. edulis* [Viarengo et al., 1988; Livingstone et al., 1988; Lemaire et al., 1993; Power, Sheehan, 1999; Cancio et al., 1999;], *M. trossulus* [Челомин и др., 1998; Довженко, 2006], *Crenomytilus grayanus* [Довженко, 2006; Лукьянова, 2006], *Geukensia demissa* [Wenning, Di Giulio, 1988a; Wenning, Di Giulio, 1988b; Wenning, Di Giulio, 1988c], *U. tumidus* [Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 2000], *Perna viridis* [Arasu, Sreenivasula-Reddy, 1995], *Anadara broughtonii* и *Modiolus kurilensis* [Довженко, 2006]. Это состояние может быть обусловлено следующими причинами.

1. Поступление кислорода из морской среды в организм моллюсков происходит преимущественно на уровне респираторных поверхностей (жабры), которые постоянно контактируют со значительными объемами воды [Шмидт-Ниельсен, 1982, Regoli, Principato, 1995]. Известно, что толщина жаберного эпителия невелика и представлена одним слоем клеток [Cui et al., 1996]. Это является необходимым условием для полноценного газообмена между гемолимфой и мантийной жидкостью. Непрерывное взаимодействие клеток жабр с молекулярным кислородом, растворенным в морской воде, а также отсутствие защитных структур в эпителии может объяснить высокую окислительную нагрузку, которую испытывает данный орган. Отсюда следует, что функция газообмена является предпосылкой к повышенному фоновому уровню окислительных процессов. Установлено, что в интенсивно аэрируемых тканях моллюсков вероятность НАД(Ф)Н-зависимой (эндогенной) продукции АФК, как правило, является наиболее высокой, чем в остальных органах [Lemaire et al., 1993, Livingstone, 2001].

2. В отличие от других тканей, в жабрах моллюсков постоянно происходят процессы регенерации, связанные с разрушением и обновлением тканевых структур [Farley, 1988; Sunila, 1988]. Это обусловлено постоянным контактом жабр с окружающей средой, а также выполнением ими не только функции газообмена, но и фильтрации [Шмидт-Ниельсен, 1982; Cossu et al., 2000]. Поэтому жаберные филаменты могут испытывать повреждающее действие, как в результате химических, так и механических воздействий [Farley, 1988; Sunila, 1988, Руднева, 2006]. Процессы деструкции тканевых и клеточных структур, как известно, сопровождаются накоплением продуктов распада, в том числе различных продуктов липопероксидации и свободных радикалов – пероксида водорода, OH^{\cdot} , $^1\text{O}_2$. Возможно, именно данные формы АФК определили высокий уровень окислительной нагрузки, выявленный в жабрах [Гостюхіна, 2008].

3. Для жабр характерна низкая фоновая АО активность. Это было показано в отношении каталазы, СОД, а также ГП, ГР [Regoli, Principato, 1995; Cossu et al., 1997; Doyotte, 1997; Regoli, 1998]. Повышенная уязвимость жаберной ткани при окислительном повреждении подтверждается также и ингибированием ряда ферментов АОС (ГП, ГР, каталазы, СОД) при действии АФК, чаще

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

наблюдаемое в этой ткани, чем в гепатопанкреасе. Это обусловлено, главным образом, отсутствием в этом органе мощных систем детоксикации и аккумуляции различных ксенобиотиков и токсикантов, в том числе и продуктов ПОЛ [Regoli, Principato, 1995; Cossu et al., 1997; Челомин и др., 1998; Regoli, 1998];

4. В отличие от других тканей эпителий жабр испытывает на себе прямое действие ксенобиотиков. Наибольший уровень окислительной нагрузки в ткани жабр моллюсков и их максимальная чувствительность к широкому спектру поллютантов отмечены в работах многих исследователей. Негативные эффекты зарегистрированы со стороны тяжелых металлов [Viarengo et al., 1990; Livingstone et al., 1992; Regoli, Principato, 1995; Doyotte, 1997; Cossu et al., 1997; Челомин и др., 1998; Cossu et al., 2000; Лукьянова, 2006; Руднева, 2006;], хлорорганических [Лукьянова, 2006] и фосфорорганических соединений [Pena-Llopis et al., 2002], полихлорбифенилов [Cheung et al., 2004], четыреххлористого углерода [Ribera et al., 1991], органических кислот [Gravato et al., 2005], нефтяных и ароматических углеводородов [Wenning, Di Giulio, 1988б; Khessiba et al., 2001], катионных детергентов [Soldatov et al., 2007], комплексного органического загрязнения [Porte et al., 1991]. Согласно мнению ряда исследователей, жабры моллюсков в силу их повышенной чувствительности к условиям водной среды можно считать органами-мишенями для выявления широкого спектра ксенобиотиков [Regoli, Orlando, 1994; Regoli, Principato, 1995].

Среди причин, лежащих в основе усиления интенсивности окислительных процессов при воздействии поллютантов, указывают нарушение структуры и функций мембран [Regoli, Principato, 1995; Лукьянова, 2006], ингибирование ряда АО ферментов [Cossu et al., 1997; Doyotte, 1997; Cossu et al., 2000], окисление SH-групп белков и низкомолекулярных тиоловых соединений, в том числе GSH [Winston, Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001], цитотоксическое действие ряда АФК [Меньшикова, Зенков, 1993; Livingstone, 2001], а также участие ПОЛ в формировании неспецифического адаптационного ответа на действие различных ксенобиотиков [Livingstone et al., 1990; Winston, Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001].

Отсюда следует, что максимальный уровень ПОЛ в жабрах мидий обусловлен как функциональной спецификой данного органа, так и высокой чувствительностью его к действию ряда ксенобиотиков.

Как отмечалось, в жабрах моллюсков черной и коричневой морфы установлена высокая активность ГП и ГР и низкий уровень GSH, что свидетельствует о высокой скорости оборота данного соединения [Гостюхина, 2008]. При этом GSH может выступать, как в роли кофактора ГП, так и выполнять самостоятельную АО функцию. Показано, что GSH способен эффективно обезвреживать ряд АФК и продуктов СРО:

- непосредственно реагирует с H_2O_2 [Мецлер, 1980; Кения и др., 1993];
- хорошо улавливает синглетный кислород 1O_2 , а также агрессивный и реакционноспособный гидроксильный радикал (OH^\bullet) [Осипов и др., 1990; Кения и др., 1993]. Это особенно важно, поскольку данный вид АФК не имеет специализированных ингибиторов в силу высокой неспецифичности его реакций с органическими молекулами [Зенков, Меньшикова, 1993];
- перехватывает органические радикалы ROO^\bullet с образованием GS-радикала и его последующей димеризацией в дисульфид (GSSG) [Косовер, Косовер, 1979; Кулинский, Колесниченко, 1990а; Кения и др., 1993].

Известно, что жабры в естественных условиях подвергаются воздействию многочисленных механических и химических агентов внешней среды. В результате происходит непрерывное разрушение тканевых и клеточных структур жабр. В ряде исследований показано значительное деструктивное влияние на жабры тяжелых металлов [Farley, 1988; Sunila, 1988], нефтяных и ароматических углеводородов [Moore et al, 1988; Moore, 1988; Moore, 1992]. Эти изменения носят хронический характер. В процессе последующей регенерации также происходит деформация жаберной ткани [Sunila, 1988], гистопатологические изменения – разрыв или слипание жаберных филаментов, разъединение соединительных элементов между ними, нарушение структуры и функций жаберного эпителия вплоть до дегенерации и некроза клеток и тканей [Farley, 1988; Sunila, 1988]. В результате подобных изменений в жабрах может развиться острая воспалительная реакция [Farley, 1988]. Она реализуется при активном участии фагоцитов и лизосом [Moore et al., 1988; Sunila, 1988], которые осуществляют фагоцитоз поврежденных клеточных элементов [Sunila, 1988]. Активация лизосомального аппарата в цитоплазме клеток показана при нарушении структуры и атрофии тканей у *M. edulis* [Moore et al., 1988; Viarengo et al., 1988; Moore, 1992]. Процессы аутофагии протекают при участии ряда АФК – OH^\cdot , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, интенсивно генерируемых фагоцитирующими клетками в очаге воспаления [Осипов и др., 1990; Зенков, Меньшикова, 1993; Меньшикова, Зенков, 1993].

Активация лизосом и рост содержания АФК в цитоплазме клеток позволяет предположить, что их обезвреживание осуществляется за счет цитоплазматических компонентов АО комплекса, в первую очередь глутатиона. Участие ГП в данном процессе маловероятно, так как этот фермент неэффективен в отношении повышенных концентраций H_2O_2 . Роль каталазы, локализованной в пероксисомах, может быть также незначительной в инактивации H_2O_2 . Об этом свидетельствовала низкая активность фермента в жабрах, которая была значительно меньше, чем в гепатопанкреасе. Следовательно, ведущая роль в компенсации окислительной нагрузки в жабрах принадлежит глутатиону, который реализует самостоятельное АО действие в отношении указанных видов АФК [Гостюхина, 2008].

Функционирование ГП и пероксидазы в клетках жабр, вероятно, связано с обезвреживанием гидроперекисных соединений липидов (ROOH). Об этом свидетельствовала высокая активность этих ферментов, обнаруженная нами у мидии [Гостюхина и др., 2005]. В литературе имеются сведения о важной роли ГП в обезвреживании различных видов ROOH. ГП способна восстанавливать почти все виды органических гидроперекисей в клетке [Бондарь и др., 1989; Кулинский, Колесниченко, 1993], предупреждать накопление вторичных продуктов пероксидации [Колесниченко, Кулинский, 1989; Кулинский, Колесниченко, 1993]. Пероксидаза также играет важную роль в инактивации ROOH в жабрах. Данный фермент имеет достаточно высокую специфичность и эффективно обезвреживает ряд гидроперекисных соединений: метил- и этилгидроперекиси, метиловый, этиловый и другие алифатические спирты [Лукьянова и др., 1982]. Очевидно, пероксидаза дополняет функционирование ГС, обеспечивая защиту жабр от действия процессов ПОЛ на стадии разветвления цепных реакций и образования вторичных перекисных продуктов [Гостюхина и др., 2005; Гостюхина, 2008].

Таким образом, в жабрах мидий всех исследованных групп выявлена высокая интенсивность процессов ПОЛ, о чем свидетельствует максимальное

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

содержание ТБК-активных продуктов. Компенсация окислительной нагрузки осуществлялась преимущественно с участием ГС. Низкий уровень GSH на фоне высокой активности ГП и ГР свидетельствует о высокой скорости оборота этого соединения. За этим может стоять как самостоятельная АО роль GSH, так и участие данного соединения в качестве кофактора ГП. В инактивации гидроперекисных соединений наряду с ГС принимала участие и пероксидаза, о чем свидетельствует высокая активность этого фермента в данном органе.

Гепатопанкреас. Как отмечалось выше, АО комплекс гепатопанкреаса моллюсков отличался высокой активностью каталазы и пероксидазы при повышенном уровне ТБК-активных продуктов в ткани. Это наблюдалось на фоне минимальной активности СОД. Состояние ГС характеризовалось высокой активностью ГП и ГР при максимальном содержании GSH в ткани.

Специфика окислительного статуса гепатопанкреаса в первую очередь определяется тем, что в этом органе происходят процессы биоаккумуляции и детоксикации различных химических соединений [Winston et al., 1990; Winston, Di Giulio, 1991; Cossu et al., 1997; Cossu et al., 2000; Livingstone, 2001]. Это может происходить на фоне высокой скорости процессов регенерации гепатоцитов путем активации лизосомального аппарата клетки с участием АФК [Farley, 1988; Sunila, 1988; Moore, 1992]. Отсюда следует, что фоновый уровень ПОЛ в гепатопанкреасе должен быть сравнительно высок. Известно, что эндогенная продукция АФК, как правило, является наиболее интенсивной в органах, осуществляющих процессы биотрансформации [Lemaire et al., 1993; Livingstone, 2001].

Максимальный уровень активности каталазы и пероксидазы, утилизирующих пероксид водорода, отражает существенный вклад этого соединения в развитие окислительных процессов в гепатопанкреасе. Несмотря на общность субстрата, эти ферменты имеют разное сродство к нему, что и обуславливает специфику участия каждого из них в обезвреживании H_2O_2 [Мецлер, 1980; Уайт и др., 1981; Меньшикова, Зенков, 1993]. Каталаза – фермент с наиболее высоким числом оборотов, имеющий низкое сродство к H_2O_2 . Это определяет ее ведущую роль в инактивации высоких концентраций данного соединения [Фридович, 1979; Уайт и др., 1981; Меньшикова, Зенков, 1993; Брюханов и др., 2004]. Пероксидаза, напротив, проявляет высокое сродство к субстрату и уступает каталазе в скорости ферментативной реакции, осуществляя инактивацию не только H_2O_2 , но и других перекисных соединений [Фридович, 1979; Лукьянова и др., 1982]. Максимальная активность пероксидазы в гепатопанкреасе свидетельствует об эффективном перехвате гидроперекисей липидов, а также H_2O_2 в малых концентрациях. Различия в функциональной активности ферментов пероксидного комплекса позволяют им, включаясь в каскад АО реакций на разных этапах развития СРО, обеспечивать сдерживание роста продуктов ПОЛ и защиту клеток гепатопанкреаса от окислительного повреждения [Гостюхина, 2008].

В условиях функциональной нормы H_2O_2 может образовываться в различных органоидах клетки [Лукьянова и др., 1982; Осипов, 1990; Зоров и др., 2005].

- В пероксисомах – до 45 % от общего количества в реакциях окисления ряда субстратов. Эти процессы происходят с участием специализированных ферментов – оксидазы D-аминокислот, L- α -гидроксиоксидазы, оксидазы жирного ацил-КоА, уратоксидазы и других [Лукьянова и др., 1982; Зоров и др., 2005].

Глава 2

- В дыхательной цепи митохондрий – до 15 % от общего количества H_2O_2 . В этом случае пероксид водорода является промежуточным продуктом в реакциях превращения субстратов митохондриального окисления, особенно при высокой степени восстановленности компонентов дыхательной цепи – убихинона, сукцинатдегидрогеназы, цитохрома b, железосерных центров и других [Лукьянова и др., 1982; Livingstone et al., 1992; Зоров и др., 2005].

- В цитозоле образуется до 5 % от общего уровня H_2O_2 в клетке с участием ферментов ксантинооксидазы и альдегидоксидазы, а также в реакции дисмутации СОАР, катализируемой СОД [Мишин, Ляхович, 1976; Лукьянова и др., 1982; Побережкина, Осинская, 1989; Зенков, Меньшикова, 1993].

- В процессе микросомального окисления в ходе НАДФН-зависимой генерации H_2O_2 при биотрансформации и детоксикации ксенобиотиков различной химической природы [Лукьянова и др., 1982; Winston, Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001; Зоров и др., 2005].

Первые два из указанных путей характерны для гепатоцитов и протекают в печени аэробных организмов. Механизм образования H_2O_2 , связанный с реакцией дисмутации СОАР, в данном случае маловероятен в силу низкой активности СОД, инактивирующей СОАР. Механизм НАДФН-зависимой генерации H_2O_2 стоит прокомментировать более детально.

Осуществление функций детоксикации и регенерации связано с активацией ряда фагоцитирующих клеток, в том числе макрофагов печени [Лукьянова и др., 1982; Sunila, 1988; Moore, 1992]. Согласно литературным сведениям, этот процесс сопровождается специфическим явлением – так называемой «дыхательной вспышкой», включающей ряд этапов, в том числе усиленное потребление кислорода и НАДФН-зависимую генерацию СОАР и H_2O_2 [Лукьянова и др., 1982; Livingstone, 2001]. Выделяют два основных источника H_2O_2 при оксидации НАДФН микросомами – функционирование флавопротеида НАДФН-цитохром-*c*-редуктазы (P-450) и процесс его аутооксидации. НАДФН-зависимый путь определяется оксидазной активностью эндогенного НАДФН. Инициация процесса определяется протекающей в микросомах реакцией НАД(Ф)Н с молекулярным кислородом, продуктом которой является H_2O_2 [Лукьянова и др., 1982; Jewell, Winston, 1988; Winston, Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001].

Установлено, что НАД(Ф)Н-зависимое микросомальное окисление в гепатоцитах моллюсков ответственно и за образование СОАР [Jewell, Winston, 1988; Washburn, Di Giulio, 1988; Winston et al., 1990]. Однако СОАР, образующийся в данной реакции, не ингибируется с помощью СОД, а подвергается спонтанной неэнзиматической дисмутации [Jewell, Winston, 1988; Winston et al., 1990]. Данная особенность вполне согласуется с результатами настоящего исследования: активность СОД, обнаруженная в гепатопанкреасе, была минимальной. По-видимому, в нашем случае реакция дисмутации СОАР не определяла высокие значения активности каталазы. Следовательно, в естественных условиях обитания моллюсков низкая продукция СОАР в гепатопанкреасе обуславливает минимальное участие СОД в АО процессах.

Активность НАД(Ф)Н-редуктаз обнаруживается в различных типах тканей гидробионтов (рыб, моллюсков), а НАДФН-зависимое образование H_2O_2 – один из ключевых путей в метаболизме этого соединения в гепатопанкреасе [Livingstone et al., 1990; Livingstone et al., 1992]. Максимальная интенсивность данного процесса

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

зарегистрирована для органов пищеварения и биотрансформации ксенобиотиков (печень, гепатопанкреас). Наличие НАД(Ф)Н-зависимого пути генерации H_2O_2 и других АФК показано в микросомах печени ряда видов рыб: камбалы *Platichthys flesus*, *Limanda limanda* [Lemaire et al., 1993; Livingstone et al., 1993], радужной форели *Oncorhynchus mykiss* [Di Giulio et al., 1989], кефали *Mugil cephalus* [Wofford, Thomas, 1988]. А также – у ракообразных *Procambarus clarkii* [Jewell, Winston, 1988] и в микросомах гепатоцитов разных моллюсков – *Mytilus edulis* [Garcia Martinez et al., 1992; Lemaire et al., 1993; Garcia Martinez, Livingstone, 1995; Livingstone, 2001], *Geukensia demissa*, *Rangia cuneata* [Wenning, Di Giulio, 1988a; Wenning, Di Giulio, 1988b, Wenning, Di Giulio, 1988c].

Как упоминалось выше, в ходе НАДФН-зависимой генерации свободных радикалов наряду с H_2O_2 образуются и другие виды АФК – $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} и 1O_2 . Следовательно, активное образование пероксида водорода и других продуктов СРО имеет важное физиологическое значение и является необходимым для реализации детоксикационных, антибактериальных, регуляторных и других свойств клетки [Лукьянова и др., 1982; Зенков, Меньшикова, 1993; Меньшикова, Зенков, 1993]. В частности, показано, что продукты ПОЛ в низких физиологических концентрациях участвуют в регулировании ряда важных функций организма, а также в биосинтезе некоторых биологически активных веществ [Владимиров, Арчаков, 1982; Лукьянова и др., 1982; Бурлакова, Храпова, 1985; Зенков, Меньшикова, 1993; Меньшикова, Зенков, 1993].

В гепатопанкреасе моллюсков на фоне максимального содержания GSH отмечена сравнительно высокая активность ферментов ГС. Соотношение уровня GSH и величин активности ГП и ГР говорит о функционировании ГС, направленном на наращивание ресурса GSH в клетке. Это позволяет предположить, что ГС не принимает активного участия в разложении H_2O_2 . Такая стратегия может быть обусловлена следующими причинами:

- подготовкой ГС к инактивации низких концентраций пероксида водорода и гидроперекисей после устранения большей части данных соединений с помощью каталазы и пероксидазы;
- поддержанием ресурса данного метаболита на высоком уровне, что важно как для работы GSH в качестве кофактора ГП [Косовер, Косовер, 1979; Меньшикова, Зенков, 1993; Кения и др., 1993], так и для выполнения им самостоятельной АО функции [Косовер, Косовер, 1979; Соколовский, 1988; Кулинский, Колесниченко, 1990а; Кулинский, Колесниченко, 1990б; Кения и др., 1993].

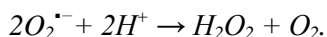
Максимальный резерв GSH в гепатопанкреасе согласуется и с высокой активностью каталазы и пероксидазы, которые обеспечивают расщепление H_2O_2 и гидроперекисей в клетке. Инактивирующее действие GSH в отношении токсического пероксида водорода и гидроперекисных соединений, вероятно, дополняет работу данных ферментов. Сочетание АО свойств GSH и указанных АО ферментов обеспечивает гибкую регуляцию и эффективную защиту гепатопанкреаса от окислительного действия перекисных продуктов.

Таким образом, АО комплекс гепатопанкреаса мидий направлен на нейтрализацию высоких концентраций H_2O_2 и других гидроперекисей. На это указывает высокая активность каталазы и пероксидазы. Эти процессы не связаны с реакцией дисмутации СОАР, на что указывает минимальная активность СОД.

Участие ГС в нейтрализации окислительных процессов в гепатопанкреасе выражено слабо.

Нога. В отличие от жабр и гепатопанкреаса уровень окислительных процессов в данном органе мидий был минимальным, на что указывало наименьшее содержание ТБК-активных продуктов. Активность СОД, напротив, достигала наиболее высоких значений, тогда как активность каталазы была наименьшей. Такое соотношение процессов свидетельствует о высокой продукции СОАР без последующей нейтрализации данного соединения.

Инактивация СОАР посредством СОД предполагает образование в качестве продукта реакции H_2O_2 [Мишин, Ляхович, 1976; Дубинина, 1989; Поберезкина, Осинская, 1989]:



Однако в этом случае наличие высокоактивной СОД вступает в противоречие с низкой активностью каталазы, зарегистрированной в настоящем исследовании. Закономерно возникает вопрос о судьбе образующегося в данной реакции пероксида водорода.

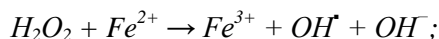
Установлено, что СОАР способен частично инактивировать каталазу, что может служить причиной ее низкой активности [Дубинина, Шугалей, 1993]. В работах ряда авторов описаны процессы с участием H_2O_2 , в результате которых происходит расщепление этого соединения неферментативным путем – без участия каталазы. В частности, отмечается, что пероксид водорода, образующийся в реакции дисмутации, способен вступать во взаимодействие со своим стехиометрическим предшественником (СОАР) в цепной реакции Габера-Вейсса с образованием высокореактивного гидроксильного радикала OH^{\cdot} и синглетного кислорода O_2^1 [Фридович, 1979; Зенков, Меньшикова, 1993]:



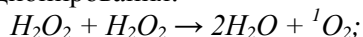
Известно, что возникновение OH^{\cdot} и O_2^1 как сопутствующих продуктов происходит во многих реакциях (с участием СОД, каталазы, пероксидаз) [Лукьянова и др., 1982; Зенков, Меньшикова, 1993]. Это дает основание предположить, что указанный процесс является весьма распространенным и предполагает дальнейшее превращение H_2O_2 , образующегося в реакции дисмутации СОАР.

Существуют и иные реакции превращения пероксида водорода с образованием других видов АФК, которые, в свою очередь, могут быть инактивированы неферментативным путем [Зенков, Меньшикова, 1993]:

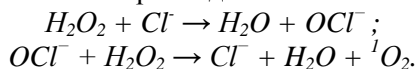
- реакция Фентона с участием металлов переменной валентности (главным образом Fe^{2+}):



- реакция диспропорционирования:



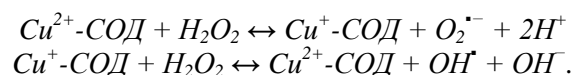
- реакции с участием миелопероксидазы:



Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

Образующиеся $^1\text{O}_2$ и OH^\bullet в силу высокой реакционной способности не имеют специализированных перехватчиков и обезвреживаются с помощью низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата, α -токоферола, каротиноидов, мочевой кислоты, а также других АО агентов – урацила, салицилатов, глюкозы, гистидина, диметилсульфоксида, аминокислот, одно- и многоатомных спиртов [Зенков, Меньшикова, 1993; Кения и др., 1993; Меньшикова, Зенков, 1993]. Однако большинство из указанных перехватчиков является внеклеточными. Вследствие этого образование высокоактивных видов радикалов должно было привести к усилению содержания в клетке ТБК-активных продуктов. Однако в настоящем исследовании этого не наблюдалось. Следовательно, вероятность протекания АО процессов в ткани ноги по указанному механизму невелика.

Несмотря на высокую специфичность к СОАР, в определенных условиях СОД способна взаимодействовать с продуктом реакции дисмутации – пероксидом водорода, и выступать в качестве прооксиданта, инициируя генерацию СОАР и OH^\bullet радикала [Меньшикова, Зенков, 1993]:



Образование СОАР в клетках разных тканей может быть обусловлено его непосредственным участием в процессах повреждения биологических структур: индукции ПОЛ мембран, окисления SH-групп белков, нарушении структуры многих биологически важных соединений, в том числе в деполимеризации гликозаминогликанов (гиалуроновой кислоты) и разрушении коллагеновых структур мышечной ткани [Мишин, Ляхович, 1976; Фридович, 1979; Lemaire, Livingstone, 1993; Дубинина, Шугалей, 1993; Меньшикова, Зенков, 1993; Челомин и др., 1998].

В основании ноги мидии *M. galloprovincialis* находится железа, вырабатывающая биссус [Заика и др., 1990], основным компонентом которого является коллаген [Qin, Waite, 1998; Coyne, Waite, 2000; Lucas et al., 2002]. В процессе жизнедеятельности моллюска периодически происходит повреждение и образование новых волокон [Заика и др., 1990]. Принимая во внимание роль СОАР в деполимеризации компонентов коллагена, можно предположить, что данный радикал активно участвует в процессах восстановления нитей биссуса. Это, вероятно, и определило высокий уровень СОАР в ноге. Усиление продукции СОАР, как отмечается в литературе, по принципу обратной связи может приводить к активации транскрипции соответствующих генов (soxRS-области ДНК), запускающих синтез СОД [Меньшикова, Зенков, 1993], что приводит к еще большей активации фермента. Возможно, работа СОД была направлена на образование СОАР, и в ходе указанного процесса не происходило накопление H_2O_2 , что согласуется с низкой активностью каталазы и минимальным уровнем ТБК-активных продуктов, выявленными нами. Это позволяет рассматривать данный механизм как наиболее вероятный для объяснения соотношения активностей АО ферментов в ноге моллюска [Солдатов и др., 2003; Soldatov et al., 2007].

Таким образом, АО комплекс ноги мидий, предположительно, был ориентирован на генерацию СОАР. Об этом свидетельствует высокая активность

СОД на фоне низкой активности каталазы и минимального содержания ТБК-активных продуктов в ткани. Такое соотношение процессов, вероятно, связано с функциональной специализацией ноги моллюска – продукцией и регенерацией биссусных волокон.

2.2.5. Цветовой полиморфизм раковины и АО ферментный комплекс тканей мидий

Из представленной выше информации следует, что организация АО комплекса тканей особей различных цветовых групп была близкой. Однако при сопоставлении абсолютных значений регистрируемых показателей между моллюсками с пигментированными (черные, коричневые) и депигментированными тканями были обнаружены существенные различия. У мидий с ДТ:

- в большинстве тканей (гепатопанкреас, жабры) наблюдали высокий уровень ТБК-активных продуктов, что отражает более высокую интенсивность процессов ПОЛ в тканях (табл. 2.1) [Солдатов и др., 2003];
- в системе ГС отмечалось явное напряжение: содержание GSH было снижено, а активность сопряженных с ним ферментов (ГП и ГР) повышена (рис. 2.2; 2.3); активность пероксидазы также была высокой (рис. 2.5); это позволяет говорить о том, что в тканях моллюсков с ДТ идет активное образование гидроперекисей [Солдатов и др., 2003; Гостюхина, 2005];
- активность СОД, напротив, была снижена (жабры, нога); для каталазы различия не были выявлены (рис. 2.4) [Солдатов и др., 2003].

Сопоставление состояния АО ферментного комплекса тканей моллюсков с черной и коричневой окраской раковины не позволило выявить каких-либо существенных отличий [Александрова и др., 2001; Александрова и др., 2002; Гостюхина и др., 2005]. Только в отношении ГР отмечена более высокая активность у моллюсков черной морфы (рис. 2.3). Для тканей особей коричневой морфы была характерна повышенная активность пероксидазы [Гостюхина, 2005] (рис. 2.5). В остальном полученные значения показателей были близкими.

Различия в пигментации тканей моллюсков могут определяться присутствием в них каротиноидов. Известно, что эта группа соединений является важным звеном АО комплекса тканей гидробионтов [Бриттон, 1986; Поляков, Лешина, 2006; Маока, Etoh, 2010; Гостюхина и др., 2012; Солдатов и др., 2013]. Каротиноиды способны эффективно перехватывать синглетный кислород [Shimidzu et al., 1996], их содержание в организме моллюсков-фильтраторов в 5-6 раз превышает отмеченное для других систематических групп организмов и является их специфической особенностью [Бриттон, 1986; Vjerkeng et al., 1993; Vershinin, 1999]. Значительное снижение содержания каротиноидов безусловно должно сказаться на состоянии всего АО комплекса тканей моллюсков и привести к его качественной трансформации. Это обусловило необходимость определения суммарного содержания данной группы пигментов в тканях трех цветовых морф моллюска (табл. 2.2).

Из таблицы 2.2 видно, что содержание каротиноидов в теле у всех цветовых групп моллюска имеет явную тканевую специфику. Максимум отмечается в гепатопанкреасе, а минимум – в ноге. При этом уровень содержания этих соединений у моллюсков с ДТ был многократно ниже. Различия достигали 24-33

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

раз. У моллюсков с пигментированными тканями (черные, коричневые) полученные значения были близкими [Солдатов и др., 2003].

Таблица 2.2

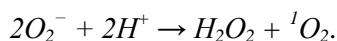
Содержание каротиноидов в тканях мидий разных цветовых морф, мг·100 г⁻¹ сырой ткани

Ткани	Группы моллюсков					
	Черные		Коричневые		Моллюски с ДТ	
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
ГЕП	7	17,5±3,61	11	17,4±2,04	5	0,73±0,1314*
Жабры	7	0,53±0,11	13	1,24±0,34	5	0,049±0,0117*
Нога	6	1,75±0,65	12	2,0±0,41	5	0,061±0,0129*

Примечание: ГЕП – гепатопанкреас; n – число особей; * – достоверны при $p \leq 0,001$

В исследованиях, выполненных на двустворчатом моллюске *Anadara inaequalvis*, было показано, что между содержанием каротиноидов в тканях и состоянием АО ферментного комплекса существует обратная зависимость [Гостюхина и др., 2012]. Известно, что данная группа соединений является одной из самых эффективных «ловушек» синглетного кислорода (¹O₂), которая в 35-540 раз превосходит связывающую способность α-токоферола [Shimidzu et al., 1996]. Одна молекула β-каротина способна «потушить» около 1000 молекул ¹O₂ до того, как β-каротин подвергнется деградаци в результате окисления [Осипов, 1990]. Отсюда следует, что депигментация тканей у мидий могла сопровождаться ростом содержания в них ¹O₂. К процессам, обеспечивающим образование ¹O₂, можно отнести следующие реакции: Фентона, Габера-Вейсса, спонтанной дисмутации O₂⁻, разложения H₂O₂ каталазой и ряд других [Фридович, 1979; Осипов и др., 1990; Меньшикова, Зенков, 1993].

Синглетный кислород представляет собой один из видов электронно-возбужденного состояния кислорода. От основного (триплетного) состояния молекулярного кислорода его отличает внутримолекулярная перестройка электронов и наиболее высокий энергетический уровень. Это определяет повышенную химическую активность ¹O₂: участие в индуцировании ПОЛ, цитотоксическое и мутагенное действие [Лукьянова и др., 1982; Осипов и др., 1990; Меньшикова, Зенков, 1993]. В качестве примеров путей образования ¹O₂ можно привести реакции сильных окислителей (например, гипохлорита) с H₂O₂, а также неэнзиматическую дисмутацию СОАР [Лукьянова и др., 1982; Осипов и др., 1990]:

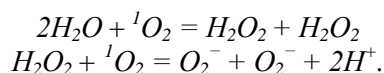


Одной из наиболее типичных для ¹O₂ реакций является взаимодействие с двойной связью, в результате которого образуются диоксиэтаны, способные в дальнейшем переходить в гидроперекиси [Осипов и др., 1990].

Эта особенность ¹O₂ имеет особое значение в инициации процессов ПОЛ в биомембранах. Показано, что образование гидроперекисей липидов с участием синглетного кислорода приводит в дальнейшем к развитию цепных реакций

окисления биосубстратов. Это происходит в результате образования различных видов АФК в процессе разложения гидроперекисей в фотохимических реакциях, либо в присутствии металлов переменной валентности [Осипов и др., 1990]. Следовательно, рост содержания активированных форм кислорода (1O_2 , H_2O_2 , O_2^-) на фоне снижения ресурсов ферментной системы АО защиты клетки предполагает усиление процессов перекисного окисления липидов. Сравнение содержания ТБК-активных продуктов в тканях пигментированных и депигментированных моллюсков подтвердило данную закономерность – у последних она была существенно выше.

Синглетный кислород является короткоживущим видом АФК. Время его существования составляет 10^{-6} - 10^{-12} с [Меньшикова, Зенков, 1993]. Однако при отсутствии или низком содержании пигментов, нейтрализующих 1O_2 , это может приводить к накоплению в тканях других форм активированных метаболитов кислорода, например H_2O_2 и O_2^- [Лукьянова и др., 1982; Осипов, 1990; Зенков, Меньшикова, 1993]:



Рост содержания H_2O_2 и O_2^- может иметь ряд негативных последствий для ферментов АО защиты клетки. СОАР способен активировать реакции ПОЛ, разрушать мембраны клеток, частично инактивировать каталазу, он участвует в образовании большого числа других форм АФК (H_2O_2 , HO_2^* , OH^* , 1O_2) [Мишин, Ляхович, 1976; Осипов, и др., 1990; Дубинина, Шугалей, 1993; Меньшикова, Зенков, 1993; Зоров и др., 2005]. Пероксид водорода оказывает на клетку цитотоксическое действие, участвует в образовании крайне реакционноспособного гидроксильного радикала, нарушает структуру и функции многих биологически важных молекул, в том числе ферментов, за счет окисления SH-групп и метионильных остатков белков [Фридович, 1979; Лукьянова и др., 1982; Меньшикова, Зенков, 1993; Зоров и др., 2005]. Известно также инактивирующее действие H_2O_2 в отношении СОД [Дубинина, Шугалей, 1993]. В настоящем исследовании эта ситуация действительно могла иметь место. У моллюсков с депигментированными тканевыми структурами активность СОД во всех изученных тканях была значительно ниже, чем у особей черной и коричневой морф. Низкая активность СОД, в свою очередь, предполагает увеличение содержания O_2^- в клетке, который способен подавлять активность каталазы [Дубинина, Шугалей, 1993].

Свидетельством роста содержания продуктов ПОЛ в тканях депигментированных животных явилось и значительное снижение уровня GSH по сравнению с пигментированными мидиями. В жабрах и гепатопанкреасе это происходило на фоне увеличения активности ГП. Подобное соотношение содержания GSH и активности ГП указывает на активное участие ГС в компенсации окислительной нагрузки у особей с ДТ.

Известно также, что окраска тканей животных может определяться пигментами меланинового ряда. Это обусловлено активностью тирозиназы, катализирующей синтез меланина [Hearing, Ekel, 1976]. В литературе отмечается наличие взаимосвязи между состоянием АО системы и меланиновыми пигментами. Так, показано, что важную регуляторную роль в метаболизме тирозина играет GSH и сопряженные с ним ферменты [Спиридонова, 1990; Байкова и др., 2000].

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

Отмечается также прямая взаимосвязь между функциональной недостаточностью системы глутатиона и нарушениями метаболизма тирозина [Байкова и др., 2000]. В настоящем исследовании отмечено значительное уменьшение резерва GSH ряда тканей моллюска. Это могло послужить одной из причин выявленной у моллюсков депигментации тканей на фоне снижения АО ресурса [Солдатов и др., 2003].

Таким образом, наиболее существенные различия в организации АО ферментного комплекса были обнаружены между моллюсками с пигментированными (коричневые, черные) и депигментированными тканевыми структурами. Депигментация приводила к повышению интенсивности процессов ПОЛ, о чем свидетельствовало увеличение содержания ТБК-активных продуктов в тканях. Это происходило на фоне уменьшения содержания GSH и увеличения активности ферментов, нейтрализующих различные виды гидроперекисей (ГП и пероксидазы). Активность СОД была снижена. Причиной данного состояния может служить крайне низкое содержание каротиноидов и, как следствие, уменьшение способности тканей противостоять образованию $^1\text{O}_2$ и других форм активированных кислородных метаболитов.

2.3. Система АО защиты тканей мидий в условиях естественного окислительного стресса

Двустворчатые моллюски отвечают всем требованиям, предъявляемым к организм-биомониторам [Христофорова, 1989; Ringwood et al., 1999; Romeo et al., 2003]. Они активно используются в диагностике состояния водной среды, особенно представители рода *Mytilus* [Pellerin-Massicotte, 1994; Porte et al., 1991; 2001; 2002]. Считается, что контроль за состоянием АО ферментного комплекса тканей моллюсков-фильтраторов позволяет косвенно судить о качестве морских акваторий [Doyotte et al., 1997; Rodriguez-Ortega et al., 2002; Gorinstein et al., 2003]. При этом многие авторы обычно не учитывают естественную динамику активности АО ферментов, которая может тесно коррелировать с состоянием животных, абиотическими условиями среды и поэтому не всегда адекватна величине антропогенной нагрузки. Разграничение этих эффектов – необходимое условие качественной экодиагностики морской среды. Этим аспектам проблемы и посвящены настоящий и последующие разделы.

2.3.1. Влияние естественных состояний на систему АО защиты и процессы ПОЛ у моллюсков

Во многих исследованиях отмечается, что состояние АО ферментного комплекса тканей двустворчатых моллюсков претерпевает периодические изменения на протяжении годового цикла. Это показано как для морских (*M. galloprovincialis*, *Saccostrea cucullata*, *P. viridis*, *Dreissena polymorpha*, *Scapharca inaequivalvis*) [Wenning, Di Giulio, 1988; Sole et al., 1995; Power, Sheehan, 1996; Sheehan, Power, 1999; Cancio et al., 1999; Niyogi et al., 2001; Gorinstein et al., 2003; Vlahogianni, Valavanidis, 2007], так и пресноводных видов (*U. tumidus*, *Corbicula fluminea*) [Power, Sheehan, 1996; Doyotte et al., 1997; Sheehan, Power, 1999; Cossu et al., 2000; Cheung et al., 2001; Vidal et al., 2002a; Vidal et al., 2002b; Солдатов и др., 2008]. В летний период в гепатопанкреасе и жабрах моллюсков регистрируют, как

правило, увеличение активности АО ферментов, содержания GSH, α -токоферола, витамина С и каротиноидов, а в зимний – снижение. Динамика интенсивности ПОЛ носит обратный характер: наибольшее содержание продуктов ПОЛ отмечают зимой, а наименьшее – летом [Viarengo et al., 1991; Sole et al., 1995b; Power, Sheehan, 1996; Viarengo et al., 1997; Regoli, 1998; Niyogi et al., 2001; Vidal et al., 2002].

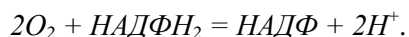
Сведения о сезонной динамике АО активности и интенсивности ПОЛ у мидий неоднозначны. Имеется информация о том, что в гепатопанкреасе и жабрах на протяжении года активность каталазы не претерпевает существенных изменений [Power, Sheehan, 1996], тогда как в исследованиях [Cancio et al., 1999], напротив, зарегистрирован однозначный рост активности данного фермента с апреля по июнь. Активность ГТ в жабрах растет с сентября по март, максимальна – в декабре [Sheehan, Power, 1999], а в гепатопанкреасе не претерпевает существенных изменений [Power, Sheehan, 1996; Sheehan, Power, 1999].

Причины, определяющие сезонную динамику активности АО ферментов и процессов ПОЛ, связывают, в первую очередь, с репродуктивными циклами [Power, Sheehan, 1996; Sheehan, Power, 1999], изменением содержания углеводов и липидов в тканях [Vidal et al., 2002], обеспеченностью пищей [Viarengo et al., 1991] и т.д.

Нерест является важнейшим физиологическим состоянием моллюсков [Viarengo et al., 1991; Power, Sheehan, 1996]. На примере черноморской мидии рассмотрим его особенности, которые могут оказывать влияние на АО комплекс и процессы ПОЛ. Репродуктивный цикл у мидии включает три последовательных этапа – гаметогенез, собственно нерест и постнерестовое состояние.

В период гаметогенеза в генеративной ткани моллюсков преобладают процессы синтеза белка, липидов и гликогена [Мотавкин, Вараксин, 1983; Viarengo et al., 1991]. Последний способен преобразовываться в липиды развивающихся гонад [Мотавкин, Вараксин, 1983; Иванович, 2005]. Повышение содержания липидов создает предпосылки для активации ПОЛ [Мотавкин, Вараксин, 1983; Power, Sheehan, 1996; Иванович, 2005]. На этом фоне происходит увеличение тканевого дыхания [Viarengo et al., 1991], что способствует интенсификации СРО, и, как следствие, компенсаторной активации АО системы.

Вымет гамет у мидий происходит порционно, гонады при этом находятся в состоянии частичного нереста. Данная стадия характеризуется началом резорбции генеративной ткани, которая представляет собой массовый некроз клеток, что сопровождается активацией автолитических процессов, деструкцией мембранных и других структур, катаболизмом различных соединений [Мотавкин, Вараксин, 1983; Viarengo et al., 1991]. В этих процессах велика роль фагоцитов, которые уничтожают старые и разрушающиеся клетки с помощью АФК путем повреждения клеточных мембран при окислительной модификации. Происходит так называемый «дыхательный взрыв», то есть быстрое поглощение клеткой кислорода с последующим образованием АФК при помощи НАДФН-оксидазы дыхательного взрыва [Лукьянова и др., 1982]:



Указанные реакции протекают не только в гонадах, что обусловлено инфильтрацией генеративной ткани в другие органы моллюсков в период нереста [Power, Sheehan, 1996; Иванович, 2005].

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

Важным звеном контроля репродуктивных процессов у двустворчатых моллюсков является нейрогормональная регуляция. При вымете половых продуктов в гемоцель поступает большое количество нейросекрета. Половые гормоны могут попадать в различные ткани [Viarengo et al., 1991] и усиливать тем самым АО функции клеток [Viarengo et al., 1991; Дас, Молик, 2004]. Возможно, этим объясняется повышение АО активности в период нереста не только в генеративной, но и в других тканях моллюсков [Wenning et al., 1988; Power, Sheehan, 1996; Челомин и др., 1998; Dickinson, Forman, 2002]. Наряду с гормонами, показано участие ряда биогенных аминов в гонадогенезе двустворок [Viarengo et al., 1991]. Установлено, что они оказывают регуляторное действие на интенсивность ПОЛ и систему АО защиты [Viarengo et al., 1991]. Это также может способствовать росту активности АО ферментов, выявленному в период нереста моллюсков [Wenning et al., 1988; Челомин и др., 1998; Niyogi et al., 2001; Dickinson, Forman, 2002; Vidal et al., 2002; Gorinstein et al., 2003].

Одним из естественных процессов, влияющих на активность АО ферментов и процессы ПОЛ у моллюсков, является старение. Показано, что наиболее высоким уровнем продуктов ПОЛ в гепатопанкреасе отличаются моллюски самой старшей возрастной группы (свыше 10 лет) [Viarengo et al., 1989]. В сравнении с более молодыми особями (2-4 года) различия составили 120 %. У старых моллюсков наблюдали значительное (на 30-40 %) снижение уровня GSH и α -токоферола в тканях.

Дополнительным подтверждением усиления ПОЛ при старении моллюсков явились результаты воздействия на них аноксии с последующей реоксигенацией. Показано, что быстрое возобновление исходно высокого уровня продуктов ПОЛ наблюдается только у мидий самой старшей группы. Содержание GSH и α -токоферола в их тканях, напротив, характеризуется минимальными величинами [Viarengo et al., 1989]. Аналогичные тенденции в изменении состояния АО системы и ПОЛ в процессе старения показаны также на примере мидий (*M. edulis*) Белого моря [Sukhotin et al., 2002] и ракообразных *Gammarus locusta* [Correia et al., 2003]. При старении моллюсков в тканях происходит накопление липофусцина, отражающего усиление процессов ПОЛ на фоне снижения активности каталазы и СОД, отвечающих за утилизацию высоких концентраций СОАР и H_2O_2 [Vidal et al., 2002a; Джазаэрли, Давыдов, 2006]. Эти результаты согласуются с данными, полученными для млекопитающих, и являются подтверждением свободнорадикальной теории старения [Скулачев, 2005]. Активация СРО является универсальным механизмом процессов старения, о чем свидетельствует усиление ПОЛ при старении организмов разных таксонов [Viarengo et al., 1991; Скулачев, 2005]. Роль АО системы обсуждается как одна из ключевых в механизмах, определяющих продолжительность жизни у двустворок *Arctica islandica* и *Margaritifera margaritifera*, живущих десятки и даже сотни лет [Скулачев, 2005].

Существует ряд других естественных процессов в клетке, способных оказывать влияние на образование свободных радикалов, интенсивность ПОЛ и АО активность. Например, АФК и АФА (активные формы азота) участвуют в регуляторных и сигнальных реакциях организма – регуляции действия гормонов, ферментов и ряда биологически активных веществ. У моллюсков АФК и АФА могут служить в качестве вторичных посредников, обеспечивающих регуляцию действия гормонов путем модификации их рецепторов. Они являются

активаторами многих ферментов (протеинкиназ и др.), опосредуют иммунный ответ гемоцитов двустворчатых моллюсков путем воздействия на их рецепторы [Оксененко, 2005]. В низких концентрациях АФК и радикалы липидов способны влиять на экспрессию генов, деление клеток, а также вызывать системный ответ организма на действие факторов внутренней или внешней среды – развитие воспаления, иммунных процессов, синтез белков острой фазы, апоптоз, а также регуляцию и модификацию многих других клеточных функций [Меньшикова, Зенков, 1993; Гордеева, Лабас, 2003; Оксененко, 2005]. Указанные реакции с участием АФК и АФА могут приводить к запуску цепных реакций ПОЛ, и как следствие, – активации ферментов АО защиты клетки.

В настоящем разделе рассмотрено влияние окислительного стресса естественного происхождения на особенности АО комплекса мидий. В качестве модели выбрано состояние нереста моллюсков. Исследования выполнены на двух группах мидий – черной и коричневой морфах. Сравнивали особенности АО системы тканей моллюсков, находящихся на разных стадиях репродуктивного цикла [Финенко и др., 1990]: II–III стадия (преднерестовое состояние) и IV стадия (нерест).

2.3.2. Интенсивность процессов ПОЛ в тканях мидий в условиях нереста

Нерест вызывал существенный рост интенсивности процессов ПОЛ в гепатопанкреасе и жабрах мидий черной морфы. Содержание ТБК-активных продуктов повышалось соответственно на 54,3 % ($p \leq 0,01$) и 92,7 % ($p \leq 0,001$) (табл. 2.3). В ноге заметного увеличения продуктов ПОЛ не отмечали. Статистически значимых различий в уровне ТБК-активных продуктов в данном органе между преднерестовой и нерестовой группами моллюсков не обнаружили [Солдатов и др., 2008].

Таблица 2.3

Содержание ТБК-активных продуктов в тканях мидий черной морфы в преднерестовый и нерестовый периоды, мкмоль МДА·мг⁻¹ белка

Ткани	II-III стадии зрелости гонад		Нерест (IV стадия)	
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
ГЕП	18	883,1±59,0*	16	1361,2±157,9
Жабры	17	1446,3±133,9**	16	2787,7±310,8
Нога	16	648,9±134,1	18	584,2±97,8

Примечание: различия в однотипных тканях по отношению к группе нерестящихся моллюсков достоверны: * – при $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; n – число особей; ГЕП – гепатопанкреас

В отличие от особей черной морфы, содержание ТБК-активных продуктов в исследованных тканях мидий коричневой морфы при изменении стадии зрелости гонад существенно не изменялось (табл. 2.4) [Солдатов и др., 2008]. Различия не были статистически выражены.

Существенный рост уровня ТБК-активных продуктов, обнаруженный в гепатопанкреасе и жабрах мидий черного фенотипа, свидетельствует об усилении

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

перекисных процессов и отражает сдвиг равновесия прооксидантов и антиоксидантов в сторону развития окислительного повреждения тканей. Рост интенсивности ПОЛ может быть обусловлен следующими причинами.

Таблица 2.4

Содержание ТБК-активных продуктов в тканях мидий коричневой морфы в преднерестовый и нерестовый периоды, мкмоль МДА·мг⁻¹ белка

Ткани	II-III стадии зрелости гонад		Нерест (IV стадия)	
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
ГЕП	14	1123,2±223,0	12	945,1±115,4
Жабры	13	1412,2±234,2	12	1913,3±321,2
Нога	12	632,6±180,6	12	734,9±206,5

Примечание: n – число особей; ГЕП – гепатопанкреас

Как известно, физиолого-биохимические изменения, сопровождающие нерест моллюсков, оказывают существенное влияние не только на состояние гонад, но и многие ткани организма моллюсков. В литературе нерест характеризуется как «генерализованная нервно-рефлекторная реакция, в которой участвует весь организм» [Вараксин, 1976; Мотавкин, Вараксин, 1983]. Стадия вымета половых продуктов сопровождается началом резорбции гонад, что приводит к образованию многочисленных продуктов распада тканевых и клеточных структур, недоокисленных соединений и активирует процессы ПОЛ [Viarengo et al., 1991; Vidal et al., 2002a]. Следовательно, АФК, образующиеся в процессе резорбции гонад и поступающие в гемолимфу, могли усиливать СРО в гепатопанкреасе и жабрах моллюсков [Солдатов и др., 2008]. Это подтверждают данные о способности АФК преодолевать мембранные барьеры. Эффекты транспорта через клеточные и внутриклеточные мембраны путем диффузии или по анионным каналам известны для наиболее стабильных из АФК – H₂O₂ и СОАР [Дубинина, Шугалей, 1993].

Нельзя исключать из внимания и усиление реакций ПОЛ в тканях мидий в результате активации катаболизма собственных тканевых структур для обеспечения формирующихся гонад пластическим материалом. Содержание гликогена и суммарных липидов в жабрах и гепатопанкреасе существенно повышается к моменту завершения созревания гамет, а после вымета половых продуктов резко снижается [Wu et al., 2007]. Следовательно, трансформация этих соединений, связанная с их дальнейшим поступлением в генеративную ткань, может сопровождаться усилением процессов ПОЛ и приводить к росту содержания ТБК-активных продуктов у особей черной морфы [Солдатов и др., 2008].

Увеличение содержания моноаминов в генеративной ткани к моменту вымета половых продуктов может приводить к повышению чувствительности тканей моллюска к физическим и химическим факторам внешней среды. Это отмечается не только в отношении гонад, но и других тканей мидий, в том числе жабр [Мотавкин, Вараксин, 1983]. В частности, установлено, что серотонин изменяет проницаемость клеточных мембран и механизмы внутриклеточного транспорта [Вараксин, 1976; Мотавкин, Вараксин, 1983]. Под действием серотонина происходит усиление фильтрационной активности двустворчатых моллюсков и, как следствие, интенсивности питания [Дьяконова, 2001]. Это

позволяет предположить, что подобное влияние моноаминов способствовало активации ПОЛ и развитию окислительного стресса в жабрах мидий черной морфы [Солдатов и др., 2008]. Причины отсутствия изменений уровня ТБК-активных продуктов в организме мидий коричневой морфы остаются невыясненными.

2.3.3. Состояние АО ферментной системы тканей мидии в условиях нереста

Черная морфа. Реакции ГС в гепатопанкреасе мидий черной морфы были отмечены только со стороны ГП, активность которой в состоянии нереста возросла в 1,75 раза ($p \leq 0,001$). Ее величина составила $68,9 \pm 4,9$ мкмоль $GSSG \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (рис. 2.6). Активность ГР и содержание GSH оставались без изменений (рис. 2.6, рис. 2.7) [Солдатов и др., 2008, Гостюхина, 2008].

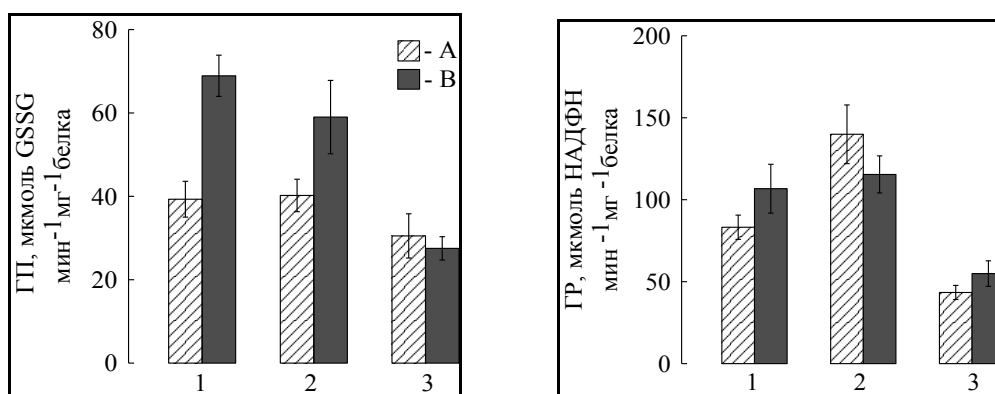


Рис. 2.6. Активность ГП и ГР в тканях мидий черной морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

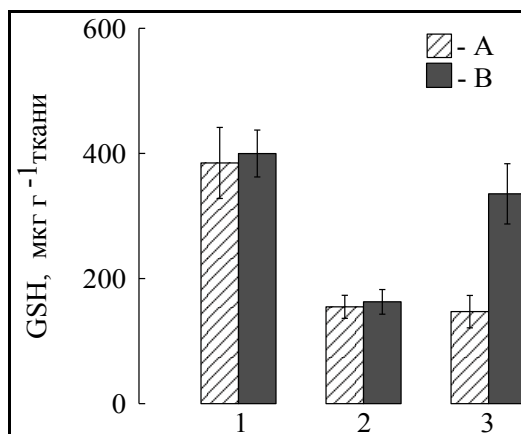


Рис. 2.7. Содержание GSH в тканях мидий черной морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

Активность каталазы в гепатопанкреасе в условиях нереста увеличилась на 45,5% ($p \leq 0,05$), достигнув величины $1606,3 \pm 170,2$ мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (рис. 2.8). В активности СОД и пероксидазы значительных изменений в период

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

нереста обнаружено не было (рис. 2.8, 2.9) [Гостюхина и др., 2005; Солдатов и др., 2008].

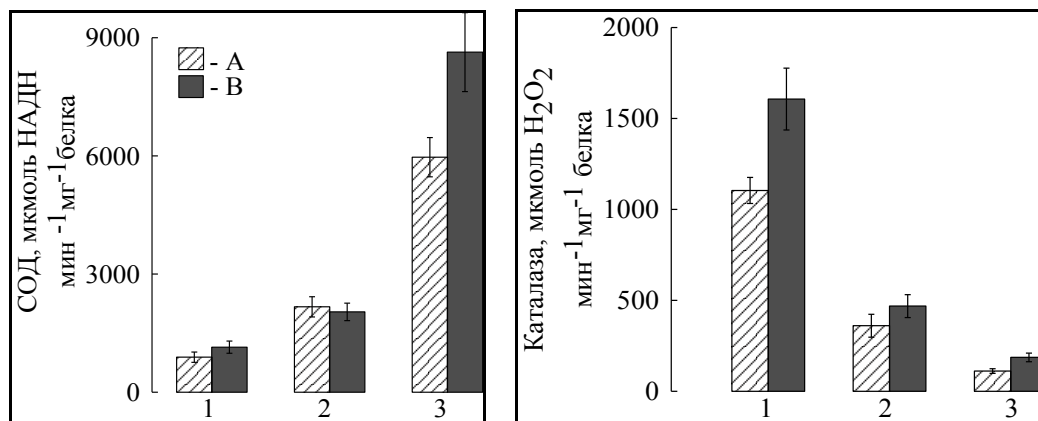


Рис. 2.8. Активность СОД и каталазы в тканях мидий черной морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

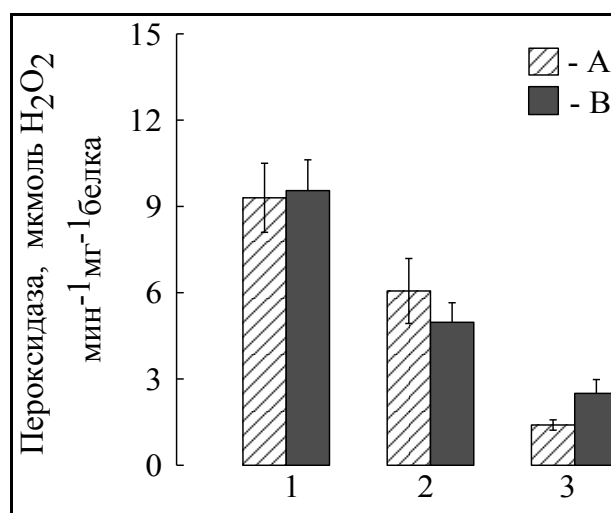


Рис. 2.9. Активность пероксидазы в тканях мидий черной морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

Нерест не вызывал существенных изменений в АО комплексе жабр моллюска. Содержание GSH, а также величины активности всех изученных ферментов у особей обеих групп были близкими (рис. 2.6-2.9).

В ноге, напротив, зарегистрированы выраженные реакции со стороны системы СОД-каталаза и пероксидазы. Уровень активности СОД вырос до $8634,1 \pm 1003,8$ $\mu\text{моль НАДН} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{белка}$. В сравнении с преднерестовым состоянием различия составили 1,45 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 2.8). Для каталазы и пероксидазы увеличение составило соответственно 1,7 и 1,8 раза ($p \leq 0,001$). При

этом абсолютные значения данных показателей достигали $186,0 \pm 23,8$ мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка и $2,5 \pm 0,48$ мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (рис. 2.8, 2.9) [Солдатов и др., 2008; Гостюхина и др., 2005].

Из показателей ГС существенные изменения выявлены только в содержании GSH, уровень которого в условиях нереста увеличился на 76,4 % ($p \leq 0,05$) и достигал $335,4 \pm 48,2$ мкг $\cdot \text{г}^{-1}$ ткани (рис. 2.7), тогда как активность ГП и ГР не изменялась [Солдатов и др., 2008].

Коричневая морфа. Активность ГП в гепатопанкреасе особей коричневой морфы, так же как и черной, в условиях нереста увеличивалась в 1,7 раза ($p \leq 0,001$). Одновременно отмечали и рост активности ГР – в 1,65 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 2.10). Абсолютные значения активности составили для ГП – $55,5 \pm 4,2$ мкмоль $\text{GSSG} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка, а для ГР – $110,2 \pm 15,9$ мкмоль $\text{НАДФН} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (рис. 2.10). Уровень GSH при этом не претерпевал статистически значимых изменений (рис. 2.11) [Солдатов и др., 2008]. Такое соотношение процессов в ГС позволяет констатировать ускорение оборота GSH в гепатопанкреасе.

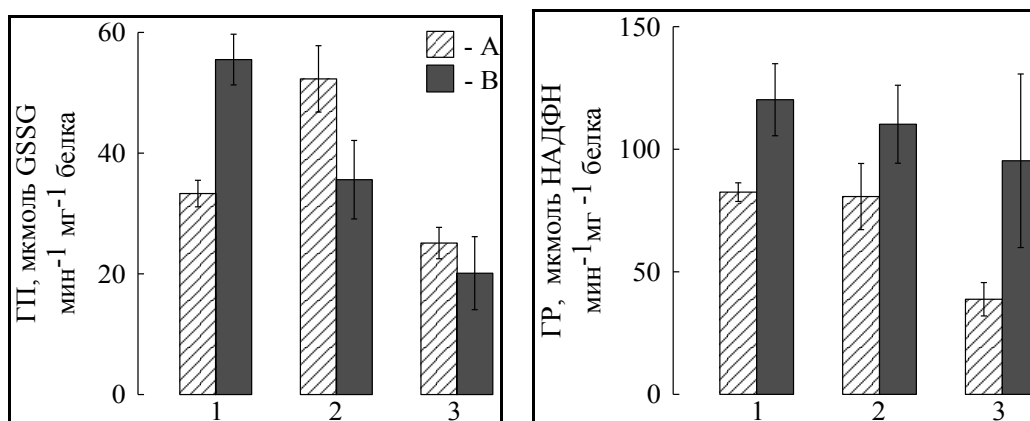


Рис. 2.10. Активность ГП и ГР в тканях мидий коричневой морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

В гепатопанкреасе нерестившихся моллюсков отмечено также увеличение активности пероксидазы в 1,5 раза ($p \leq 0,001$), которая составила $10,1 \pm 1,25$ мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (рис. 2.12). Эта реакция не совпадала с данными, полученными для гепатопанкреаса моллюсков с черной раковинкой, где активность пероксидазы в течение нереста не изменялась [Солдатов и др., 2008; Гостюхина и др., 2005].

В активности СОД и каталазы в гепатопанкреасе мидий коричневого фенотипа, находящихся на разных стадиях репродуктивного цикла, достоверных различий не наблюдали (рис. 2.13) [Солдатов и др., 2008].

В течение нереста в жабрах моллюска отмечали снижение уровня гидроперекисей, о чем косвенно свидетельствовал рост активности ГР, повышение содержания GSH и понижение активности пероксидазы (рис. 2.10, 2.11, 2.12). Активность остальных ферментов не изменялась (рис. 2.10, 2.13). Близкие изменения происходили и в ноге животных (рис. 2.10, 2.11).

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

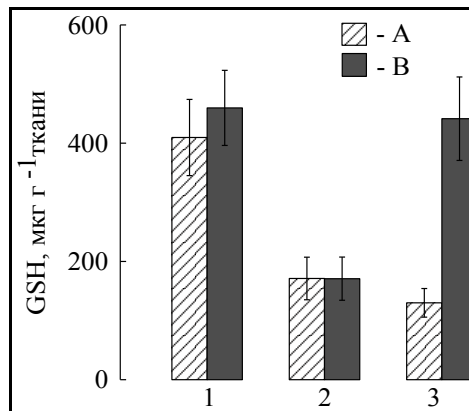


Рис. 2.11. Содержание GSH в тканях мидий коричневой морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

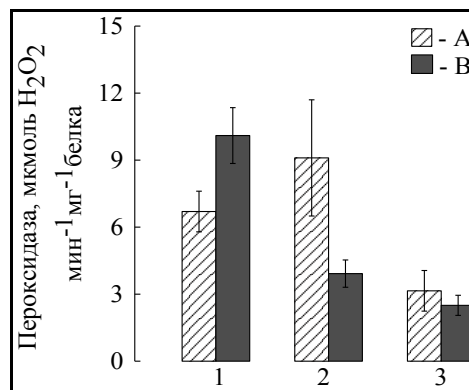


Рис. 2.12. Активность пероксидазы в тканях мидий коричневой морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

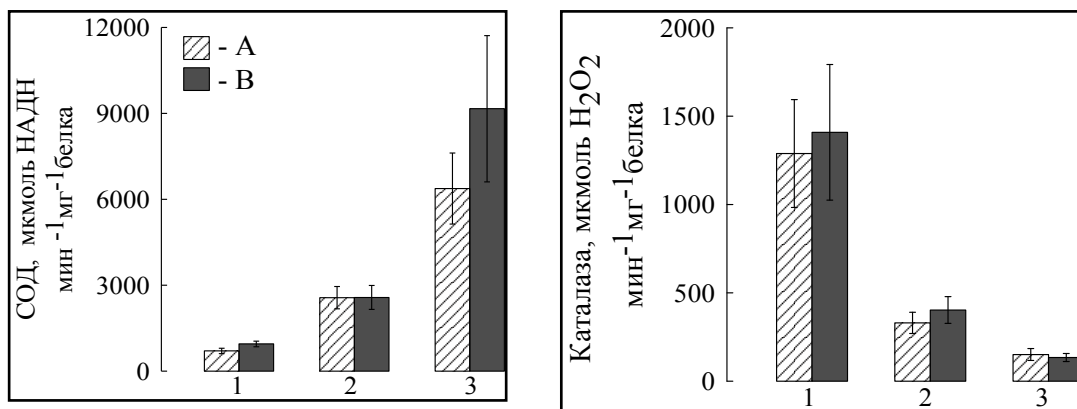


Рис. 2.13. Активность СОД и каталазы в тканях мидий коричневой морфы (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – II-III стадии зрелости гонад, В – IV стадия зрелости гонад)

Совокупность представленных результатов позволяет сделать ряд обобщений.

- Наибольшую окислительную нагрузку в период нереста испытывают ткани мидий черной морфы, о чем свидетельствует рост ТБК-активных продуктов и повышение активности большинства ферментов АО комплекса.
- Повышенную чувствительность к состоянию нереста у обеих цветовых морф проявлял гепатопанкреас. В нем отмечался рост активности ферментов, сопряженных с ресурсом GSH, а также каталазы (черная морфа) и пероксидазы (коричневая морфа). Это косвенно свидетельствует о повышении содержания в данном органе H_2O_2 и других гидроперекисей.
- Нерест не сказывался на состоянии АО ферментного комплекса жабр мидий. Содержание GSH и активность всех АО ферментов сохранялись на преднерестовом уровне.

2.3.4. Вероятные пути влияния состояния нереста на АО ферментный комплекс тканей мидий

Выявленный рост активности систем утилизации перекисных соединений (ГС, пероксидазы, каталазы) обусловлен, вероятно, возросшими концентрациями H_2O_2 и гидроперекисей липидов в тканях моллюсков. Среди причин активации указанных компонентов АО системы можно выделить следующие.

О росте активности ГП. В процессе гаметогенеза у мидий происходит усиление нейросекреторной активности ганглиев и обильное накопление нейросекрета в глиальных клетках. К моменту вымета половых продуктов наступает полное освобождение этих клеток от нейросекреторного материала, который поступает в гемоцель моллюска [Мотавкин, Вараксин, 1983]. С аксональным током и током гемолимфы половые гормоны способны транспортироваться не только в гонады, но и в другие ткани моллюска – гепатопанкреас, жабры [Wenning et al., 1988; Кулинский, Колесниченко, 1990а; Челомин и др., 1998; Зоров, 2005]. Известно активирующее влияние некоторых половых гормонов, в частности 17- β -эстрадиола, на ГП и каталазу [Кулинский, Колесниченко, 1993], что становится особенно важным в состоянии нереста моллюсков. Активация ГП гормонами у нерестившихся моллюсков тем более вероятна, что ГП – не конститутивный, а индуцибельный фермент [Кулинский, Колесниченко, 1993; Бачурин, 2001].

Необходимо отметить и роль биогенных аминов в усилении активности ферментов АО защиты клетки. Показано участие катехоламинов, серотонина, дофамина в регуляции гонадогенеза двустворчатых моллюсков [Мотавкин, Вараксин, 1983]. Наиболее высокое содержание серотонина совпадает с максимальной интенсивностью продукции нейросекрета и соответствует стадии нереста моллюсков [Вараксин, 1976; Мотавкин, Вараксин, 1983]. Моноамины, в частности серотонин и его производные, способны оказывать непосредственное ингибирующее действие на продукты ПОЛ, а также активировать систему АО защиты в условиях окислительного стресса, в частности каталазу и ГП [Бачурин, 2001; Лось, 2001].

Как уже отмечалось, в процессе вымета половых продуктов выделяется

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

огромное количество органического вещества, в том числе и продуктов распада белка [Брайко, 1979]. Одним из продуктов белкового катаболизма является мочевая кислота. Показано, что это вещество представляет собой основной субстрат пероксисом печени, где оно разрушается в уратоксидазной реакции с образованием H_2O_2 [Лукьянова и др., 1982]. Большая часть образовавшегося пероксида водорода утилизируется внутри пероксисом каталазой, с чем вероятно связано выявленное повышение активности этого фермента. Однако часть H_2O_2 (11-42 %) может диффундировать из пероксисом в цитоплазму, где инактивируется преобладающей там ГП [Лукьянова и др., 1982; Меньшикова, Зенков, 1993; Зенков, Меньшикова, 1993].

Процесс резорбции не может не затрагивать и многочисленные мембранные структуры клеток, в результате разрушения которых могут образовываться гидроперекисные производные липидов. ГП способна эффективно утилизировать невысокие концентрации гидрофильных гидропероксидов с малыми размерами молекул [Бондарь и др., 1989]. Это позволяет предположить, что активация ГП в гепатопанкреасе может быть обусловлена указанными реакциями, так как участие этого фермента в нейтрализации высоких концентраций H_2O_2 – менее вероятный процесс. Увеличение содержания гидропероксидов, вероятно, способствовало и активации пероксидазы, участвующей наряду с ГП в обезвреживании этих соединений [Солдатов и др., 2008; Гостюхина и др., 2005].

Необходимо также отметить способность ГП к защите каталазы от окисления в условиях повышенных окислительных нагрузок [Дубинина, Шугалей, 1993], что также могло послужить причиной повышения активности обоих ферментов.

О росте содержания GSH. Повышение уровня GSH, зарегистрированное в ткани моллюсков, вероятно, определяется самостоятельным АО действием данного соединения [Soldatov et al., 2007; Солдатов и др., 2008]. Как известно, биологические функции глутатиона чрезвычайно широки. GSH способен оказывать прямое ингибирующее действие на H_2O_2 [Кения и др., 1993] и ряд других опасных видов АФК – $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , а также перехватывает органические радикалы ROO^{\cdot} [Косовер, Косовер, 1979; Кулинский, Колесниченко, 1990а; Кения и др., 1993]. Следовательно, учитывая широкий диапазон АФК, защиту от которых способен обеспечивать GSH, можно предположить, что его функционирование в организме моллюска дополняет работу АО ферментов. Самостоятельная АО роль GSH становится тем более значимой, если принять во внимание характерное для мышечной ткани небольшое количество ГП [Лукьянова и др., 1982]. Более того, в литературе отмечается, что в условиях активного наращивания в клетке АФК, защитное действие низкомолекулярных антиоксидантов, и в частности, GSH, оказывается более эффективным, чем работа АО ферментов. Это обусловлено в первую очередь избыточностью и относительной свободой миграции GSH в клетке [Кения и др., 1993].

Рост активности ГР, очевидно, связан с процессами ресинтеза GSH. Известно, что при функционировании ГС, в отличие от других GSH-зависимых систем, не происходит невосстановимых потерь GSH, так как переход GSH в его дисульфидную форму в данных АО реакциях носит обратимый характер. Ключевым моментом в этих процессах является восстановление GSSG в GSH. Катализ данной реакции и осуществляет ГР. Этот фермент высоко специфичен к

своим субстратам – GSSG и НАДФН, поэтому накопление в клетке окисленной формы глутатиона всегда вызывает его активное восстановление посредством ГР [Кулинский, Колесниченко, 1990а; Кулинский, Колесниченко, 1990б; Кения и др., 1993]. Именно этот процесс, по-видимому, и реализовался в ряде тканей мидий, находящихся в нерестовом состоянии [Soldatov et al., 2007; Солдатов и др., 2008].

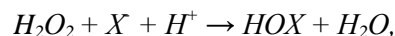
О повышении активности системы СОД-каталаза в ноге. Как упоминалось выше, в ноге мидий черной морфы в состоянии нереста установлено существенное повышение активности систем низкого сродства к субстрату – СОД и каталазы, функционирующих во взаимосвязи. Как показано в разделе 2.2, АО комплекс ткани ноги мидий в основном ориентирован на генерацию АФК, участвующих в регуляции синтеза коллагена биссусного аппарата. Возможно, повышение активности СОД и каталазы, выявленное в ноге, также связано с процессами образования и разрушения нитей биссуса [Soldatov et al., 2007; Солдатов и др., 2008].

В исследованиях на *Mytilus edulis* показана сезонная динамика развития биссусных нитей, обусловленная гидродинамическими явлениями и репродуктивным состоянием животных [Carrington, 2002]. Максимальная сила прикрепления нитей приходится на позднюю зиму и раннюю весну, что соответствует сезону штормов и предшествует периоду начала гаметогенеза. В период формирования половых продуктов у моллюсков наблюдается заметное снижение силы прикрепления к субстрату, которое достигает минимального уровня к моменту вымета гамет. Механизм сезонной динамики прочности биссуса, предложенный авторами, предполагает уменьшение энергетических и пластических трат, связанных с интенсивной продукцией биссуса, и перераспределение этих ресурсов на созревание гонад. Этот «энергетический компромисс» проявляется в снижении числа продуцируемых нитей, ухудшении растяжимости вследствие изменения эластических свойств коллагена. Такой сдвиг в распределении энергии сопровождается усиленным разрушением биссусных волокон, в частности коллагена, входящего в его состав [Carrington, 2002; Moeser, Carrington, 2006]. Наличие этих процессов позволяет предположить активное участие СОАР в реакциях разрушения коллагена, на что указывают и исследования других авторов [Фридович, 1979; Lemaire, Livingstone, 1993; Дубинина, Шугалей, 1993]. Следовательно, рост уровня СОАР обусловлен, предположительно, повышением активности СОД, инициирующей генерацию этого радикала в реакции с пероксидом водорода.

Итак, увеличение активности СОД в состоянии нереста, предположительно, может быть направлено на генерацию СОАР как фактора разрушения коллагеновых нитей биссуса [Soldatov et al., 2007; Солдатов и др., 2008]. В связи с этим возникает закономерный вопрос: как на фоне генерации СОАР посредством СОД объяснить рост активности каталазы при постоянном содержании ТБК-активных продуктов. В качестве причины, объясняющей выявленные реакции, можно рассматривать особенности влияния пероксида водорода на молекулы коллагена. Согласно данным литературы, H_2O_2 , наряду с СОАР, также участвует в регуляции метаболизма коллагена. В ряде модельных экспериментов показано ингибирующее действие H_2O_2 на синтез этого белка [Ramp et al., 1987; Asada et al., 1999]. Это позволяет предположить, что в условиях нереста пероксид водорода способствовал снижению синтеза коллагена биссусных волокон.

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

Роль H_2O_2 в метаболизме коллагена не исчерпывается только указанными процессами. Известно, что в присутствии миелопероксидазы H_2O_2 является основным источником образования гипогалоидов в реакциях с галидами [Зенков, Меньшикова, 1993]:



где



Гипогалоиды же способны активировать фермент коллагеназу [Зенков, Меньшикова, 1993], которая осуществляет деградацию коллагена и других фибриллярных белков соединительной ткани [Соловьева и др., 2001]. Следовательно, пероксид водорода способен приводить к снижению синтеза коллагена как непосредственно, так и опосредованно, участвуя в генерации гипогалоидов, активирующих коллагеназу.

Источниками генерации H_2O_2 в условиях работы СОД, направленной на образование СОАР, а не его дисмутацию, могут быть многочисленные ферментные системы клетки – НАДН- и НАДФН-зависимые оксидоредуктазы, транспортная цепь митохондрий, оксидазы аминокислот, ксантин- и альдегидоксидаза и другие [Лукьянова и др., 1982]. Кроме того, в менее высоких концентрациях H_2O_2 всегда образуется в реакции спонтанной дисмутации СОАР, протекающей без участия СОД [Осипов др., 1990; Зенков, Меньшикова, 1993].

Повышение в клетке концентрации H_2O_2 закономерно приводит к увеличению активности каталазы, специфически инактивирующей данный вид АФК, а также пероксидазы, участвующей наряду с каталазой в его обезвреживании. Рост активности пероксидазы может быть вызван также и нарастанием концентрации гидроперекисных соединений (ROOH) в клетках ноги и работой фермента по их утилизации. Образование указанных продуктов ПОЛ может происходить различными путями, в том числе и инициироваться отрывом H^+ от молекул органических субстратов с участием СОАР, OH^+ , 1O_2 и других типов АФК [Владимиров, Арчаков, 1982; Осипов, 1990; Меньшикова, Зенков, 1993].

Вероятно, на фоне направленной генерации СОАР и H_2O_2 в состоянии нереста моллюсков активация защитного потенциала клеток ноги является достаточной для «гашения» повышенных концентраций АФК. Об этом свидетельствует постоянный уровень ТБК-активных продуктов.

АО комплекс жабр. Во время нереста в жабрах мидий черной морфы реакций со стороны АО комплекса моллюсков не наблюдалось, несмотря на значительный рост ТБК-активных продуктов в данном органе. АО комплекс жабр в естественных условиях обитания мидии *M. galloprovincialis* [Soldatov et al., 2007] оказался наименее эффективным среди исследованных тканей моллюска, что подтверждают исследования и других авторов [Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 2000; Лукьянова, 2006; Soldatov et al., 2007]. Возможно, что в условиях нереста АО комплекс жабр является наиболее уязвимым к окислительному действию продуктов ПОЛ.

Отсутствие защитных реакций ферментов АО комплекса жабр, по-видимому, обусловлено высокой инактивирующей способностью ряда АФК по отношению к компонентам АО системы этого органа. В частности, показано

Глава 2

ингибирующее действие следующих радикалов [Дубинина, Шугалей, 1993; Меньшикова, Зенков, 1993]:

- СОАР – на активность каталазы и ГП;
- H_2O_2 – в отношении каталазы и СОД;
- гидроксильного радикала – на активность ГП и СОД;
- перекисей липидов – по отношению к ГП.

Известна высокая чувствительность каталазы, СОД и ГП к продуктам реакций, которые они контролируют [Дубинина, Шугалей, 1993]. Учитывая способность к свободному взаимному превращению наиболее агрессивных форм АФК (H_2O_2 , O_2^- и OH^\cdot) в условиях окислительного стресса [Дубинина, Шугалей, 1993; Меньшикова, Зенков, 1993; Зоров и др., 2005], можно допустить, что результатом их совместного воздействия является нарушение структуры указанных ферментов. Рост уровня АФК в клетке нередко ведет к структурно-функциональным изменениям ферментов АО защиты [Владимиров, Арчаков, 1982; Осипов и др., 1990; Дубинина, Шугалей, 1993; Зенков, Меньшикова, 1993; Зоров и др., 2005]. Как правило, это связано с нарушениями в области активного центра. Такие модифицированные белковые молекулы являются более чувствительными к протеолизу [Дубинина, Шугалей, 1993]. При усилении интенсивности процессов ПОЛ окислительные изменения могут явиться причиной падения АО потенциала, а возможно и гибели клеток [Фридович, 1979; Соколовский, 1984; Осипов и др., 1990; Дубинина, Шугалей, 1993; Livingstone, 2001].

Межморфные отличия. Реакции АО комплекса мидий черного и коричневого фенотипа на состояние нереста имели ряд принципиальных отличий.

- Моллюски черной морфы в состоянии нереста характеризовались существенным повышением уровня ТБК-активных продуктов в гепатопанкреасе и жабрах, а также повышение активности АО ферментов, как высокого, так и низкого сродства к субстрату, в сравнении с особями, находящимися в преднерестовом состоянии. Это указывает на развитие в организме мидий состояния окислительного стресса.
- У мидий коричневого фенотипа, напротив, нерест не индуцировал процессы ПОЛ. При этом наблюдалось увеличение активности только ферментов высокого сродства к субстрату (ГП, ГР).

Причины выявленных различий в состоянии АО комплекса тканей и уровне ПОЛ у моллюсков разных цветовых морф, по-видимому, следует искать в особенностях их экологии.

В природных условиях моллюски этих фенотипов приурочены к различным экотопам. Особи черной морфы населяют преимущественно твердые субстраты в прибойной зоне морских акваторий. Последние характеризуются интенсивным водообменом и, как следствие, высоким содержанием кислорода в воде, а также значительным уровнем механической нагрузки на биссусный аппарат моллюсков. Особи с коричневой раковиной населяют в основном донные биотопы, где интенсивность водообмена по сравнению с прибойной зоной снижена [Иванов и др., 1989; Заика и др., 1990]. Они уступают черным мидиям по скорости образования и прочности биссусных нитей [Иванов и др., 1989].

Различия в реакциях АО комплекса и уровне ПОЛ в тканях мидий двух фенотипов, в период нереста, можно объяснить следующими причинами.

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

- В состоянии нереста у мидий черной морфы должна происходить значительная интенсификация процессов энергетического обмена с учетом особенностей их обитания (аэрируемые слои воды) [Брайко, Дерешкевич, 1978; Брайко, 1979; Таможняя, 1989]. Это обусловлено необходимостью дополнительных энергетических затрат на развитие генеративной ткани, которая по мере созревания может составлять от 20 до 60 % массы тела [Брайко, Дерешкевич, 1978]. Известно, что за один нерест мидии расходуют 11-29 % исходного донерестового энергетического эквивалента тела [Финенко и др., 1990].
- В период нереста биогенные амины, в частности серотонин, могут повышать чувствительность жабр к факторам внешней среды. Можно допустить, что различия в содержании кислорода в среде определили разный уровень процессов СРО в тканях мидий черной и коричневой морф: более высокую интенсивность окислительных реакций в тканях скаловых мидий (черная морфа) и, наоборот, более низкую – у иловых моллюсков (коричневая морфа). Это, в свою очередь, определило различия в характере ответных реакций АО комплекса моллюсков сравниваемых групп.
- Метаболизм гликогена может стать причиной увеличения скорости СРО в тканях. Содержание этого метаболита тесно связано с периодами репродуктивного цикла моллюсков, а также с условиями их обитания, в частности с кислородным режимом морских вод [Горомосова, Шапиро; 1984, Иванович, 2005]. Количество гликогена в тканях мидий скальных форм (черная морфа) существенно выше, чем у обитающих в придонных слоях воды (коричневая морфа) [Иванович, 2005]. Этим также, отчасти, можно объяснить различия в состоянии АО комплекса и уровне ПОЛ на межморфном уровне.

Двустворчатые моллюски являются факультативными анаэробами и способны выживать при низких концентрациях кислорода, переходя на анаэробный обмен [Горомосова, Шапиро, 1984; Иванов и др., 1989]. Показано, что мидии *M. edulis*, акклимированные к низкому напряжению кислорода в среде (40-80 мм рт. ст.) и помещенные затем в гипоксические условия (20 мм рт. ст.), обнаружили после реоксигенации пониженную способность к поглощению кислорода [Дубинина, Шугалей, 1993]. Эти результаты позволяют предположить, что процессы ПОЛ в тканях моллюсков донной формы должны протекать с меньшей интенсивностью, чем у скаловой группы.

На характер защитных реакций АО комплекса ткани ноги, вероятно, решающее влияние оказали межморфные различия в количестве и качестве биссусных нитей. Известно, что СОАР и пероксид водорода непосредственно принимают участие в метаболизме коллагеновых волокон биссуса [Фридович, 1979; Ramp et al., 1987; Lemaire, Livingstone, 1993; Дубинина, Шугалей, 1993; Asada et al., 1999]. Активация АО комплекса в ноге черных особей в период нереста, по-видимому, связана с перераспределением пластических ресурсов организма в пользу генеративной ткани. Это способствует разрушению биссусных нитей и активизирует СРО в данном органе [Soldatov et al., 2007; Солдатов и др., 2008]. Особи же коричневой морфы, в отличие от черной, обитают на рыхлых грунтах, имеют более слабый биссусный аппарат, что и нашло отражение в незначительных изменениях в состоянии АО системы ткани ноги этих особей в условиях нереста.

Как известно, одна из основных ролей в создании окислительных условий морской среды принадлежит пероксиду водорода. Предпосылкой для образования H_2O_2 в морской воде служит наличие протонов водорода и кислорода [Скурлатов и др., 1984]. Изменение редокс-состояния морской среды происходит в процессе нормальной жизнедеятельности *Mytilus galloprovincialis* [Таможняя, 1989]. Наибольшее модифицирующее влияние на микроусловия своего обитания мидии оказывают в период нереста [Брайко, 1979]. По мере активации репродуктивных процессов у моллюсков возрастает интенсивность потребления кислорода [Брайко, 1979; Таможняя, 1989; Финенко и др., 1990]. Содержание H_2O_2 в морской воде в этот период снижается вплоть до полной утилизации. Показано, что пероксид водорода, поступающий в организм моллюсков из морской среды, оказывает прямое действие на индукцию нереста. Роль H_2O_2 заключается в непосредственном участии данного соединения в синтезе простагландинов посредством активации циклооксигеназы [Morse et al., 1976]. Принимая во внимание различия в содержании кислорода в воде разных экотопов, необходимого для образования H_2O_2 , можно предположить, что это соединение определяло более высокую интенсивность процессов ПОЛ именно в тканях особей черного фенотипа [Soldatov et al., 2007].

Таким образом, состояние нереста оказало наибольшее влияние на АО статус тканей мидий черной морфы, индуцируя в них процессы ПОЛ. Это отражает увеличение содержания ТБК-активных продуктов в жабрах, гепатопанкреасе и повышение активности АО ферментных систем как низкого (каталаза, СОД), так и высокого (ГР, ГП, пероксидаза) сродства к субстрату. У моллюсков с коричневой окраской раковины состояние нереста не приводило к развитию окислительного стресса. Об этом свидетельствовало неизменное содержание ТБК-активных продуктов в тканях. Нейтрализация СРО обеспечивалась преимущественно на уровне ГС. Отмеченные различия, по-видимому, определяются особенностями экотопов, к которым приурочено обитание моллюсков с коричневой и черной окраской раковины.

2.4. Система АО защиты тканей мидий в условиях экспериментальной окислительной нагрузки

Представленные ниже исследования выполнены с целью последующего сопоставления и дифференцирования эффектов окислительных нагрузок естественного (раздел 2.3) и искусственного происхождения.

Существует обширная информация о влиянии на АО комплекс и уровень продуктов ПОЛ в тканях моллюсков ксенобиотиков различной химической природы: тяжелых металлов [Livingstone et al., 1992; Челомин и др., 1998; Regoli, 1998; Canesi et al., 1999; Da Ros et al., 2000; Khessiba et al., 2001; Romeo et al., 2003], органических кислот [Gravato et al., 2005], нефтяных углеводородов, пестицидов [Wenning, Di Giulio, 19886; Viarengo et al., 1989; Di Giulio et al., 1989; Da Ros et al., 1995; Sole et al., 1996; Stein et al., 1998; Suteau et al., 1998] и др.

Среди поллютантов, присутствующих в морской среде, можно выделить две основные группы веществ:

- проявляющие токсическое действие по мере накопления в организме;
- оказывающие непосредственный повреждающий эффект.

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

К последней группе относятся детергенты. Помимо высокой скорости токсического действия они перфорируют биомембраны и инициируют в них процессы ПОЛ [Львова, 1999; Ведутенко и др., 2003; Ying, 2006]. Изучению токсического влияния этих соединений и посвящен настоящий раздел.

2.4.1. Токсические и биологические эффекты детергентов на биообъекты

Детергенты понижают поверхностное натяжение воды и входят в состав моющих средств, широко применяемых в быту и промышленности. Присутствие синтетических поверхностно-активных веществ (ПАВ) в сточных водах связано с использованием их при синтезе полимеров, разделении продуктов химических технологий, флотационном обогащении руд, борьбе с коррозией оборудования, бурении нефтяных и газовых скважин и т.д. [Паршикова, Негруцкий, 1988; Madsen et al., 2001; Айздайчер, 2006].

Структура ПАВ и механизмы их токсических эффектов. В зависимости от структуры молекул и поведения их в растворах выделяют анионоактивные, катионоактивные, амфотерные и неионогенные ПАВ [Паршикова, Негруцкий, 1988; Madsen et al., 2001].

Воздействие ПАВ на живые организмы связано с их химической структурой. Молекулы детергентов состоят из гидрофобной (неполярной) и гидрофильной (полярной) группы. Неполярная часть имеет алифатическую или алифатически-ароматическую природу. В гидрофильную часть молекулы могут входить различные функциональные группы – спиртовые, аминные, иминные, карбоксильные [Паршикова, Негруцкий, 1988]. От этих групп зависит поверхностная активность детергентов. В составе катионных ПАВ функциональную активность определяет макрокатион [Паршикова, Негруцкий, 1988; Ведутенко и др., 2003]. У тетрадецилтриметиламмоний бромид (ТДТМА), применяемого в настоящей работе, им является катион тетрадецилтриметиламмония [Madsen et al., 2001; Ведутенко и др., 2003], который вступает во взаимодействие с углеводными участками на поверхности гликокаликса клетки. Полисахариды гликолипидов и гликопротеинов гликокаликса часто оканчиваются остатками сиаловой кислоты. Именно они сообщают всей наружной поверхности клетки общий отрицательный заряд [Албертс и др., 1986; Ченцов, 1995]. Это обуславливает высокую реактивность и повышенные адгезивные свойства катионных детергентов при их взаимодействии с биомембранами. Указанные особенности способствуют усилению реакций СРО и развитию токсических эффектов в клетке, что влияет на состояние АО комплекса гидробионтов, в том числе и моллюсков [Ying, 2006].

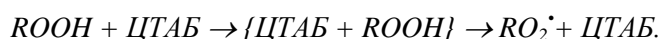
Группа катионных детергентов характеризуется наиболее высокой токсичностью действия по сравнению с анионными и неионогенными [Vincenzini et al., 1985; Bindu, Babu, 2001; Bindu et al., 2005; Ying, 2006]. Катионные ПАВ могут образовывать углеводородные радикалы, участвуя, таким образом, в окислительном метаболизме клетки [Паршикова, Негруцкий, 1988]. Поэтому они представляют прямую угрозу для целостности биомембран и окислительно-восстановительного равновесия в клетке.

В ряде модельных экспериментов исследован механизм действия катионных детергентов на биомембраны. Установлено, что в присутствии

Глава 2

катионных ПАВ в небольших концентрациях в значительной степени повышается скорость окисления природных жирных кислот с образованием гидроперекисей и других продуктов ПОЛ [Голявин и др., 2003; Кондратович и др., 2003]. На первом этапе взаимодействия ПАВ с субстратами происходит образование гидроперекисей, которые в дальнейшем формируют вместе с ПАВ агрегированные структуры типа обращенных мицелл [Голявин и др., 2003]. В них могут сорбироваться полярные продукты окисления (кислоты, спирты, вода и другие) [Ведутенко и др., 2003; Кондратович и др., 2003]. В результате образования мицелл происходит нарушение структурно-функциональных свойств мембран, мицеллы как бы захватывают мембранные липиды и выводят их из состава мембран [Львова, 1999]. Указанные изменения в конечном итоге приводят к локальному перфорированию мембраны [Львова, 1999; Касаикина, Карташева, 2003].

Предложен механизм взаимодействия катионных детергентов (на примере цетилтриметиламмоний бромида – ЦТАБ) с органическими субстратами (ROOH) [Ведутенко и др., 2003; Касаикина, Карташева, 2003]:



Образующиеся в результате этой реакции активные радикалы RO_2^* способны непосредственно инициировать цепные реакции ПОЛ в биомембранах, а также участвовать в их продолжении и разветвлении [Владимиров, Арчаков, 1982; Осипов и др., 1990; Зенков, Меньшикова, 1993].

Биологические эффекты ПАВ. Катионные ПАВ оказывают ингибирующее действие на фильтрационную активность мидий *M. galloprovincialis* и *M. edulis* [Остроумов, 2003; Остроумов, Виддоус, 2004], пресноводных унионид *Unio pictorum* и *U. tumidus* [Остроумов, Колесников, 2003] и коловраток *Brachionus angularis* [Остроумов и др., 2003], трофическую активность озерного прудовика *Lymnaea stagnalis* [Остроумов, Колесников, 2003], угнетают рост пресноводных водорослей и цианобактерий [Колотилова и др., 1998].

Установлено, что КПАВ способны оказывать селективное ингибирующее действие на ферменты млекопитающих (крыс, свиней) – дегидрогеназы и липазы [Sanford et al., 1981; Vincenzini et al., 1985]. Подчеркивается, что катионные детергенты во всех исследованных тканях оказывают более выраженное инактивирующее действие на ферменты, чем анионные [Siegel, Gordon, 1985a; 1985b; 1986; Vincenzini et al., 1985].

Однако информация о воздействии ПАВ на АО комплекс и ПОЛ животных немногочисленна. Изучено влияние катионного ПАВ цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) на АО комплекс рыбы *Oncorhynchus mossambicus*, в печени, почках и сердце которой при действии ЦТАБ было обнаружено повышение уровня ПОЛ и GSH, а также рост активности каталазы, СОД и ферментов ГС [Bindu, Babu, 2001]. Известно также о характере влияния на АО комплекс мидий анионного детергента LAS (linear alkylbenzen sulphonate). Данное соединение не оказывало существенного влияния на активность СОД, каталазы и ГП гепатопанкреаса мидий, за исключением небольшого снижения активности ферментов после 30-дневной экспозиции [Da Ros et al., 1995]. Эти результаты дополнительно свидетельствуют о менее выраженном биологическом действии анионных ПАВ по сравнению с катионными, что подтверждается и другими исследованиями [Madsen et al., 2001;

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

Bindu et al., 2005; Ying, 2006]. Сведения же об эффектах катионных ПАВ на состояние АО комплекса и ПОЛ двустворчатых моллюсков отсутствуют.

Итак, среди всех ПАВ наиболее выраженным действием на биомембраны клеток обладают катионные детергенты. Это показано в основном для наземных позвоночных. Информация же об эффектах ПАВ на АО систему и процессы ПОЛ гидробионтов ограничена.

Это определило выбор ТДТМА в качестве индуктора токсической нагрузки. Нами исследовано влияние данного соединения в концентрации 0,8 мг л⁻¹ на организм черной и коричневой морф *Mytilus galloprovincialis* Lam. Экспозиция составляла 8 суток. Температура морской воды – 6-8 °С. Результаты исследований представлены ниже.

2.4.2. Влияние ТДТМА на процессы ПОЛ и АО статус тканей мидии

ТДТМА оказывал наиболее выраженное действие на состояние системы АО защиты и процессы ПОЛ тканей особей черной морфы.

Черная морфа. В жабрах моллюсков данной морфы, подвергшихся действию детергента, выявлен наибольший рост уровня ТБК-активных продуктов. В сравнении с контрольными особями содержание данных соединений повышалось на 42,3 % ($p \leq 0,01$) (табл. 2.5) [Солдатов и др., 2007].

Таблица 2.5

Содержание ТБК-активных продуктов в тканях мидий черной морфы в контроле и условиях действия ТДТМА, мкмоль МДА·мг⁻¹ белка

Ткани	Группа моллюсков			
	Контроль		ТДТМА	
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Жабры	12	649,9±57,4*	11	925,1±101,0*
Гепатопанкреас	15	355,0±34,8	12	436,1±51,7
Нога	9	220,0±45,1	11	354,0±63,9

Примечание: * – различия достоверны при $p \leq 0,05$; n – число особей

Реакция АО комплекса жабр на присутствие ТДТМА носила дифференцированный характер. Содержание восстановленного глутатиона увеличилось в сравнении с контрольной группой в 1,7 раза ($p \leq 0,05$), достигнув значений 113,4±16,9 мкг·г⁻¹ ткани (рис. 2.14). При этом изменения в активности GSH-зависимых ферментов были разнонаправленными. Для ГР обнаружено увеличение активности в 1,45 раза до уровня 166,2±14,1 мкмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка. В активности ГП, напротив, зафиксировано достоверное снижение значения до 28,3±2,4 мкмоль GSSG·мин⁻¹·мг⁻¹ белка. В сравнении с контрольной группой различия составили 1,6 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 2.15). Такое соотношение процессов позволяет говорить о снижении оборота глутатиона в жабрах, то есть участие ГС в компенсации окислительной нагрузки было ограничено. Одновременно наблюдали и снижение активности пероксидазы до 4,1±0,91 мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.16). Активности фермента в контрольной и опытной группах различались в 1,9 раза ($p \leq 0,05$) [Солдатов и др., 2007].

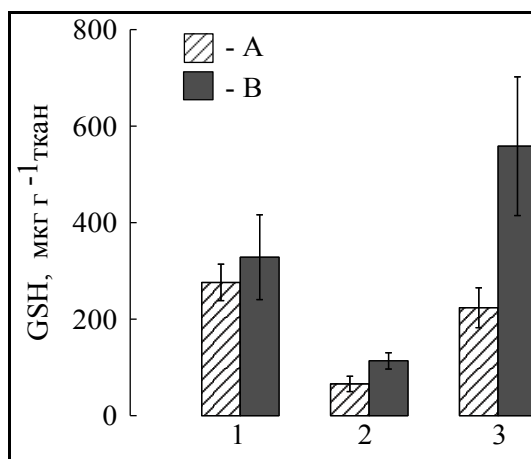


Рис. 2.14. Содержание восстановленного глутатиона в тканях мидий черной морфы при воздействии ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

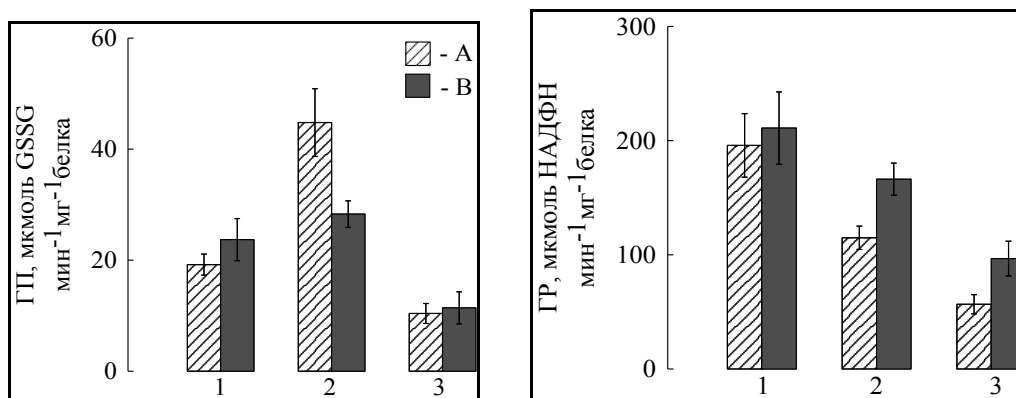


Рис. 2.15. Активность ГП и ГР в тканях мидий черной морфы при действии ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

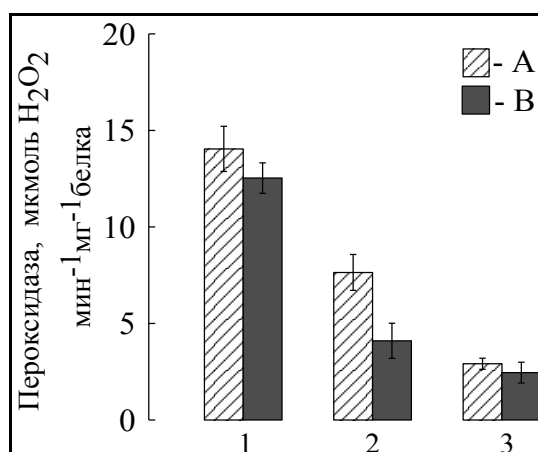


Рис. 2.16. Активность пероксидазы в тканях мидий черной морфы при действии ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

Наиболее значимые изменения были вызваны детергентом в ключевом звене системы АО защиты – СОД-каталаза. Активность СОД в жабрах увеличилась в 6,0 раз ($p \leq 0,001$) – до значения $5107,0 \pm 1101,7$ мкмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.17). Активность каталазы составила $346,2 \pm 44,9$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что в 1,7 раза выше ($p \leq 0,05$), чем в контрольной группе (рис. 2.17) [Солдатов и др., 2007]. Это означает, что окислительная нагрузка компенсировалась преимущественно за счет роста активности ферментов низкого сродства (СОД и каталазы). Участие ГС в этом процессе, как уже отмечалось, практически не было выражено.

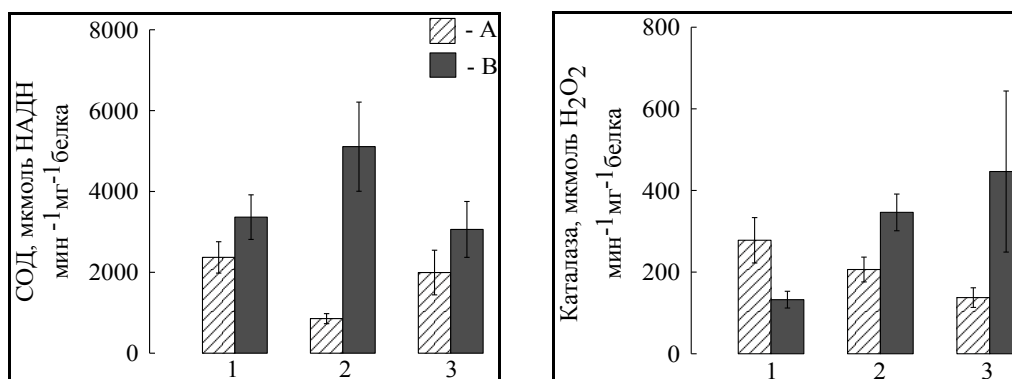


Рис. 2.17. Активность СОД и каталазы в тканях мидий черной морфы при действии ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

ТДТМА не оказал заметного влияния на содержание ТБК-активных продуктов и уровень антиоксидантной активности в гепатопанкреасе мидий черной морфы. Исключение составила каталаза, активность которой снизилась по сравнению с контролем в 2 раза ($p \leq 0,05$), составив $132,5 \pm 20,5$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.17) [Солдатов и др., 2007].

Содержание ТБК-активных продуктов в ноге моллюска при действии детергента также достоверно не изменялось (табл. 2.5). Реакции ГС, как и в жабрах, заключались в существенном росте уровня GSH и активности ГР. Содержание GSH достигало $558,3 \pm 143,7$ мкг·г⁻¹ ткани, то есть увеличение в сравнении с контрольной величиной составило 2,5 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 2.14). Активность ГР возросла в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) до $96,7 \pm 15,2$ мкмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, тогда как активность ГП, напротив, сохранялась на уровне контрольных значений (рис. 2.15) [Солдатов и др., 2007].

В активности СОД, каталазы и пероксидазы ноги мидий под воздействием детергента статистически значимых изменений обнаружено не было ввиду значительной вариабельности полученных величин. Однако характер изменений был близок к полученному для жабр моллюска (рис. 2.16, 2.17). Так, для каталазы зарегистрировано увеличение активности до уровня $446,3 \pm 197,3$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что в 3,2 раза превышало таковую у контрольной группы моллюсков. Для СОД отмечен рост активности до $3060,3 \pm 690,6$ мкмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, отличие от контрольного значения составило 1,5 раза (рис. 2.17) [Солдатов и др., 2007].

Глава 2

Представленные выше результаты исследований позволяют сделать ряд обобщений.

- Токсическое действие ТДТМА реализуется, прежде всего, на уровне периферических органов моллюска: жабр, ноги (в меньшей степени). АО комплекс гепатопанкреаса фактически не участвует в нейтрализации окислительной нагрузки.
- Продукты ПОЛ обезвреживаются в основном за счет ферментов низкого сродства к субстрату (СОД, каталаза). Равновесие в ГС смещено в сторону процессов, обеспечивающих наращивание, а не использование ресурсов GSH тканей.

Коричневая морфа. ТДТМА не оказывал значимого влияния на содержание ТБК-активных продуктов в органах моллюсков коричневой морфы (табл. 2.6). Имеющиеся различия между контрольной и опытной группами мидий не были статистически выражены.

Таблица 2.6

Содержание ТБК-активных продуктов в тканях мидий коричневой морфы в контроле и условиях действия ТДТМА, мкмоль МДА·мг⁻¹ белка [Солдатов и др., 2007]

Ткани	Группа моллюсков			
	Контроль		ТДТМА	
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Жабры	10	992,6±141,7	10	954,9±149,2
Гепатопанкреас	10	345,0±40,6	10	486,7±107,2
Нога	9	418,9±64,3	10	331,8±94,5

Примечание: n – число особей

Внесение в воду аквариума ТДТМА оказывало токсический эффект в основном на жабры моллюска. Это совпадало с результатами, полученными для особей черной морфы.

Содержание GSH в жабрах возросло в 2,75 раза ($p \leq 0,01$) и достигло уровня 115,5±32,0 мкг·г⁻¹ ткани (рис. 2.18). В отличие от моллюсков с черной окраской раковины изменения активностей ГП и ГР в жабрах были однонаправленными. Активность ГП увеличилась до 35,9±5,8 мкмоль GSSG·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что превышало значения, зарегистрированные для контрольной группы в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) (рис. 2.19). Одновременно отмечали рост активности ГР. В сравнении с контрольной группой моллюсков различия составили 1,8 раза ($p \leq 0,05$). При этом активность достигала 168,5±25,2 мкмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.19) [Солдатов и др., 2007].

Наиболее выражены были изменения в состоянии системы СОД-каталаза. Активность каталазы достигала 557,8±65,0 мкмоль Н₂О₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что в сравнении с контрольными значениями было в 3,2 раза выше ($p \leq 0,001$) (рис. 2.20). Значительно выросла в сравнении с контрольной группой моллюсков и активность СОД – в 2,6 раза ($p \leq 0,05$), достигнув уровня 3288,6±886,5 мкмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.20) [Солдатов и др., 2007].

В отличие от мидий черной морфы активность пероксидазы в жабрах мидий коричневого фенотипа при действии ТДТМА не изменялась (рис. 2.21).

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

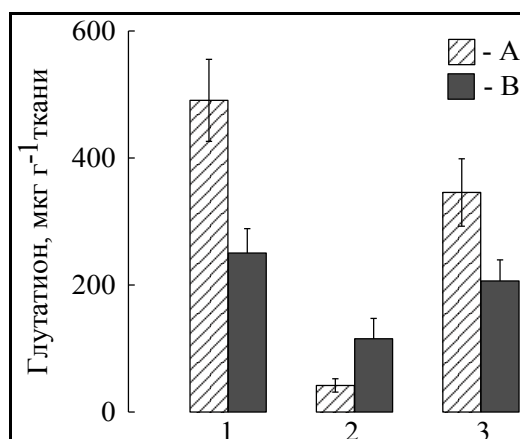


Рис. 2.18. Содержание восстановленного глутатиона в тканях мидий коричневой морфы при действии детергента ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

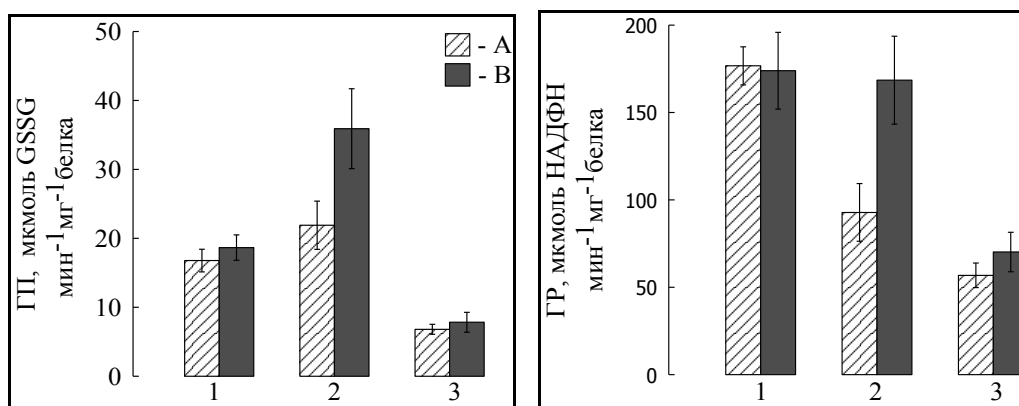


Рис. 2.19. Активность ГП и ГР в тканях мидий коричневой морфы при действии детергента ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

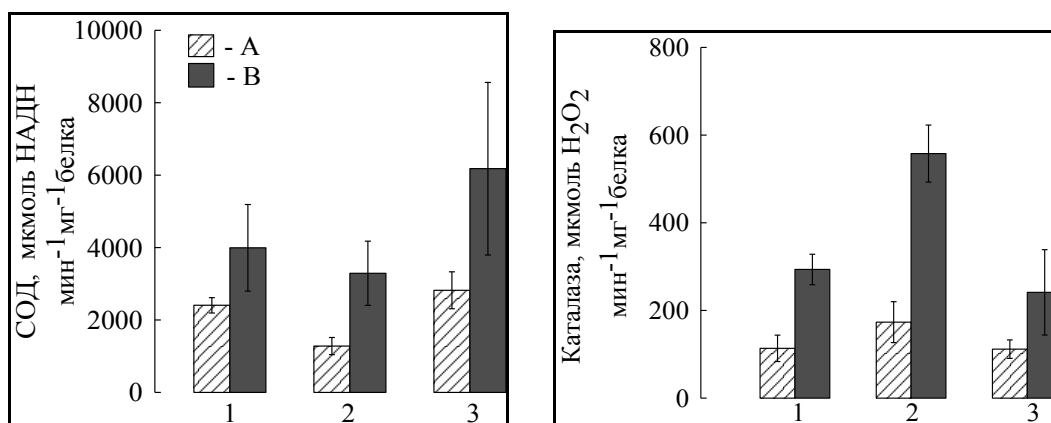


Рис. 2.20. Активность СОД и каталазы в тканях мидий коричневой морфы при действии детергента ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

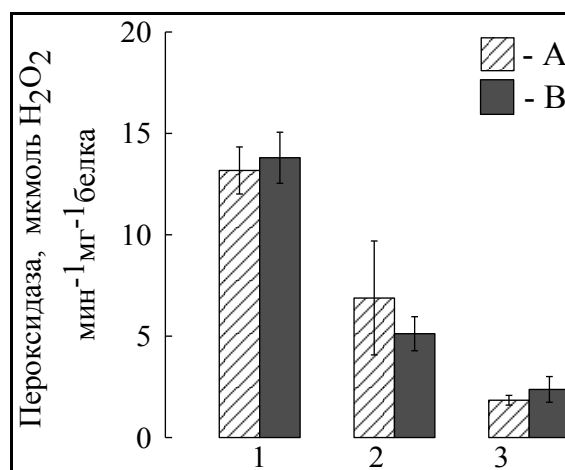


Рис. 2.21. Активность пероксидазы в тканях мидий коричневой морфы при действии детергента ТДТМА (А – контроль, В – опыт, 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога)

Действие детергента на АО статус гепатопанкреаса моллюсков было менее выраженным, чем на остальные ткани. Под влиянием ТДТМА отмечено снижение содержания GSH в 2,0 раза ($p \leq 0,01$) – до уровня $250,5 \pm 38,4$ мкг·г⁻¹ ткани (рис. 2.18). Выявлен также рост активности каталазы, который в сравнении с контрольными особями составил 2,6 раза ($p \leq 0,001$). Величина активности фермента достигала $293,4 \pm 34,8$ мкмоль H₂O₂·мин⁻¹·мг⁻¹ белка (рис. 2.20). Данные изменения не совпадали с состоянием системы АО защиты гепатопанкреаса мидий черной морфы. При этом активность ферментов ГС (рис. 2.19), пероксидазы (рис. 2.21) и СОД (рис. 2.20) сохранялась на уровне контрольных значений [Солдатов и др., 2007].

АО комплекс ноги мидий с коричневой окраской раковины в условиях токсического воздействия фактически не претерпевал существенных изменений. Единственной реакцией являлось снижение уровня GSH в ткани в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) относительно контрольного уровня при сохранении активности ГР и ГП. Это допускает непосредственное участие данного соединения в компенсации окислительной нагрузки (рис. 2.18).

Таким образом, токсическое действие ТДТМА вызывало ряд как общих с моллюсками черной морфы, так и специфичных изменений в состоянии АО комплекса тканей мидий с коричневой окраской раковины.

- ТДТМА не вызывал усиления процессов ПОЛ в тканях. Содержание ТБК-активных продуктов сохранялось на уровне контрольных значений. Различия не были статистически выражены.
- Жабры испытывают наибольшее токсическое воздействие со стороны детергента. Окислительная нагрузка компенсируется в основном на уровне системы низкого сродства к субстрату – СОД-каталазы.
- Во всех тканях отмечается снижение содержания GSH. Это происходит на фоне сохранения активностей ГР и ГП или их пропорционального роста. Это позволяет предположить непосредственное участие GSH в нейтрализации продуктов ПОЛ.

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

2.4.3. Вероятные механизмы токсического действия катионных детергентов на организм гидробионтов

Выявленные компенсационные реакции АО комплекса тканей мидий на действие ТДТМА во многом согласуются с результатами исследований, выполненных на других организмах, в частности костистых рыбах (*Oreochromis mossambicus*) [Bindu, Babu, 2001]. Так же как и в нашей работе [Солдатов и др., 2007], в тканях печени, почек и сердечной мышцы *Oreochromis mossambicus* при действии цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) было обнаружено повышение уровня ТБК-активных продуктов, а также рост активности каталазы, СОД и ферментов ГС комплекса.

Рост уровня ТБК-активных продуктов, выявленный в тканях мидий черной морфы, свидетельствует об усилении перекисных процессов и смещении баланса АО и прооксидантных процессов в сторону развития окислительного стресса. Эти реакции могут быть обусловлены как структурно-функциональными особенностями жабр моллюска, так и физико-химическими свойствами используемого нами детергента.

Как уже отмечалось, ТДТМА оказал наиболее выраженный токсический эффект на жабры мидий. Известно, что однослойный эпителий жабр моллюсков осуществляет фильтрацию и газообмен, имеет большую удельную площадь поверхности и тонкий водно-гематический барьер [Cui et al., 1996]. Вступая в непосредственный контакт с фосфолипидным слоем мембран, детергент способствует изменению их поверхностного заряда за счет взаимодействия своего активного макрокатиона с заряженными группами на мембране (сиаловые кислоты) [Wojtczak, Nałęcz, 1979]. Это может приводить к изменению физико-химических свойств и, в конечном счете, нарушению структурной целостности мембран жаберного эпителия, а также к повышению их проницаемости. В связи с этим клетки жабр принимают на себя основную токсическую нагрузку со стороны детергентов, растворенных в морской воде. Кроме того, жабры, в отличие от гепатопанкреаса, не обладают функцией биоаккумуляции ксенобиотиков, поэтому их состояние напрямую зависит от функционирования клеточных и тканевых систем биотрансформации и детоксикации поллютантов, в том числе тканевой АО системы.

Следовательно, повышенную чувствительность клеток жабр к действию ТДТМА можно объяснить выраженными адгезивными свойствами детергента и повышенной проницаемостью жаберного эпителия для воды и растворенных в ней веществ [Солдатов и др., 2007; Soldatov et al., 2007].

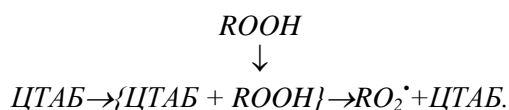
Токсическое воздействие детергента может быть обусловлено следующими процессами.

В модельных экспериментах по воздействию катионных ПАВ (в частности ЦТАБ, относящегося наряду с ТДТМА к группе алкиламмониевых солей) на окисление органических углеводов показано, что внесение небольших концентраций детергента приводит к резкому увеличению скорости реакции органических субстратов с H_2O_2 и органическими гидропероксидами (кумола, этилбензола) [Ведутенко и др., 2003; Голявин и др., 2003]. При этом отмечается, что в отсутствие ПАВ данные реакции при умеренных температурах практически не идут. Авторы делают вывод о каталитическом действии катионных ПАВ на

окисление углеводов (RH). В результате взаимодействия детергента с органическими субстратами RH на первом этапе происходит образование гидропероксида (ROOH) – первичного продукта окисления. Затем гидропероксиды образуют с ПАВ совместные микроагрегаты в виде мицелл, в которых наряду с ROOH концентрируются вода, спирты, кислоты и другие полярные продукты окисления [Hanlon, Seybert, 1997; Львова, 1999; Касаикина, Карташева, 2003]. В процессе образования мицелл происходит нарушение функциональных свойств мембраны в результате выхода молекул липидов из ее состава, что в конечном итоге приводит к деструктурированию и локальному разрушению мембраны.

В мицеллах, образованных гидропероксидами природных жирных кислот и рядом катионных ПАВ (ЦТАБ, цетилтриметиламмоний хлоридом, цетилпиридиний бромидом), протекает ускоренное окисление ROOH с образованием свободных радикалов [Касаикина, Карташева, 2003; Кондратович и др., 2003]. Предполагают, что в мицеллах при разложении гидропероксидов под действием ПАВ образуются также вещества, ускоряющие распад липидов [Голявин и др., 2003; Касаикина, Карташева, 2003].

Взаимодействие катионного детергента с органическими молекулами можно проиллюстрировать следующим уравнением [Ведутенко и др., 2003; Касаикина, Карташева, 2003]:



Радикалы RO_2^{\cdot} и ему подобные принимают непосредственное участие в инициации и разветвлении цепных реакций ПОЛ [Владимиров, Арчаков, 1982; Осипов, 1990; Меньшикова, Зенков, 1993]. Возможно, что окислительным воздействием ТДТМА на мембраны клеток и было вызвано значительное увеличение уровня ТБК-активных продуктов в жабрах мидий черной морфы.

Детергенты могут способствовать усилению повреждающего действия на клетку других токсикантов путем повышения проницаемости клеточных мембран. Это отмечено, например, для тяжелых металлов [Паршикова, Негруцкий, 1988; Козлов и др., 2003] и радионуклидов [Поликарпов, Егоров, 1986; Козлов и др., 2003]. Следовательно, причиной роста интенсивности ПОЛ в жабрах мидий при действии ТДТМА, помимо прямого повреждающего действия детергента на мембраны, могло явиться и токсическое действие других поллютантов, поступивших в жабры через поврежденные мембраны клеток.

Как показано в исследованиях на разных гидробионтах, воздействие широкого диапазона токсикантов на клетки живых организмов реализуется через активацию реакций микросомального окисления [Лукьянова и др., 1982; Jewell, Winston, 1988; Di Giulio et al., 1989; Winston, Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001]. Запуск данного механизма выявлен в тканях при действии поли- и нитроароматических углеводов [Washburn, Di Giulio, 1988; Lemaire et al., 1993; Garcia Martinez, Livingstone, 1995; Livingstone, 2001], полихлорбифенилов [Wenning, Di Giulio, 1988], хинонов [Di Giulio et al., 1989; Garcia Martinez, Livingstone, 1995], а также детергентов разных классов [Hanlon, Seybert, 1997; Babior, 1999; Myasoedova et al., 2006].

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

В процессе работы монооксигеназной системы происходит ускорение ПОЛ и образование побочных продуктов реакции – активированных кислородных метаболитов, в частности СОАР и пероксида водорода [Лукьянова и др., 1982; Di Giulio et al., 1989; Jewell, Winston, 1988; Washburn, Di Giulio, 1988; Livingstone, 2001]. Усиление микросомального окисления обнаружено, например, в тканях рыб при действии катионных (четвертичных аммониевых солей, в том числе ЦТАБ) и других типов детергентов [Hanlon, Seybert, 1997; Babior, 1999; Guhl, 1999]. Возможно, выявленное нами увеличение интенсивности ПОЛ и ответные реакции АО комплекса моллюсков были обусловлены активацией окислительной деструкции детергента в ходе микросомального окисления [Soldatov et al., 2007].

2.4.4. Состояние АО ферментного комплекса тканей мидий при действии ТДТМА

Рост активности СОД и каталазы в жабрах исследованных морф мидий, обусловлен, вероятно, накоплением в этой ткани СОАР и пероксида водорода. Оба фермента функционально взаимосвязаны и обеспечивают защиту клеток от токсического действия АФК. СОД осуществляет реакцию дисмутации СОАР, в результате которой образуется менее активный пероксид водорода [Мишин, Ляхович, 1976; Поберезкина, Осинская, 1989; Lemaire, Livingstone, 1993]. Увеличение концентрации H_2O_2 , в свою очередь, вызывает рост активности каталазы, разлагающей пероксид на кислород и воду [Фридович, 1979; Лукьянова и др., 1982; Осипов и др. 1990].

Достоверный рост ресурса GSH и повышение активности ГР в ткани жабр происходил на фоне снижения активности ГП у черной морфы и увеличения – у коричневой [Soldatov и др., 2007]. Тип отклика ГС жабр мидий черной морфы может быть обусловлен двумя причинами.

- Возможно, что глутатион в данных условиях проявляет свое самостоятельное АО действие. Собственная АО функция GSH связана с реализацией многих защитных реакций – инактивацией H_2O_2 и липидных гидроперекисных радикалов ROO^{\cdot} , а также тех видов АФК, которые не имеют специфических ингибиторов – 1O_2 , OH^{\cdot} [Косовер, Косовер, 1979; Кулинский, Колесниченко, 1990а; Осипов, 1990; Кения и др., 1993]. Подтверждением этой функции GSH является и увеличение активности ГР, обеспечивающей поддержание и наращивание уровня этого важного АО соединения в клетке [Ramos-Martinez et al., 1983]. Поэтому рост содержания GSH в жабрах можно рассматривать как свидетельство активации защитных систем клетки и формирования адаптивного ответа этой ткани на действие окислительного стресса [Кения и др., 1993].
- Не исключено также, что при действии ТДТМА ресурс GSH не задействован в АО защите. Снижение активности ГП в жабрах, вероятно, подтверждает, что действие GSH связано с его коферментной функцией в составе ГП. В этом случае функционирование ГС направлено на накопление GSH, необходимого на стадии обезвреживания низких концентраций продуктов ПОЛ после удаления их более высоких количеств посредством СОД и каталазы. Подобное состояние, по-видимому, было характерно для жабр моллюсков черной морфы, где имело место разнонаправленное изменений активностей ГР и ГП [Soldatov et al., 2007].

Глава 2

В ноге моллюсков черной морфы, в отличие от жабр, при влиянии детергента не наблюдалось изменений в уровне процессов ПОЛ, на что указывал постоянный уровень ТБК-активных продуктов. Однако отклик ГС и системы «СОД-каталаза» у моллюсков данной группы качественно совпадал с таковым в жабрах, что выражалось в повышении ресурса GSH и активностей ГР, СОД и каталазы. В АО комплексе ноги мидий коричневой морфы, напротив, происходило снижение уровня GSH. Иных реакций выявлено не было [Солдатов и др., 2007].

Более низкий, чем в жабрах, уровень окислительной нагрузки в ноге можно объяснить отличиями в структурно-функциональных особенностях данных органов. Нога, в отличие от жабр, имеет более плотный многослойный эпителий и в целом характеризуется меньшей интенсивностью обменных процессов, чем жаберная ткань. Сохранение интенсивности ПОЛ на постоянном уровне, а также менее выраженные изменения в АО статусе ткани ноги связано, вероятно, с меньшей проницаемостью мембран эпителиальных клеток этой ткани для детергента. Однако выявленные тенденции роста активности СОД и каталазы свидетельствуют о потенциально возможном сдвиге баланса прооксидантных и защитных АО процессов в ткани ноги в сторону развития окислительного стресса при действии ТДТМА.

В гепатопанкреасе мидий обеих морф при действии ТДТМА не наблюдалось усиления процессов ПОЛ, что выражалось в неизменном содержании ТБК-активных продуктов. Действие детергента не оказало влияния и на большинство показателей АО комплекса моллюсков. Изменения наблюдались только в активности каталазы и уровне GSH. В гепатопанкреасе моллюсков черной морфы отмечено снижение активности фермента, а у особей с коричневой окраской раковины – повышение. У мидий коричневого фенотипа зафиксировано также снижение уровня GSH [Солдатов и др., 2007].

Как известно, взаимодействие гепатопанкреаса с внешней средой носит опосредованный характер. Уровень токсических продуктов в данном органе зависит от их содержания в гемолимфе. Следовательно, степень токсической нагрузки на гепатопанкреас должна быть ниже, чем на периферические ткани, непосредственно контактирующие с детергентом.

Одной из основных функций ткани гепатопанкреаса является биоаккумуляция и детоксикация ксенобиотиков. У двустворчатых моллюсков он способен накапливать различные поллютанты в концентрациях, многократно превосходящих ПДК при сохранении функциональной полноценности клеточных и тканевых структур [Livingstone et al., 1992; Regoli, 1998; Челомин и др., 1998; Брень, 1999]. Гепатопанкреас обладает высокой интенсивностью обмена веществ и наиболее мощными по сравнению с другими тканями системами детоксикации ксенобиотиков. К этим системам наряду с микросомальным окислением можно отнести также ферменты биотрансформации поллютантов – глутатионтрансферазу, ацетилхолинэстеразу, 7-этоксирезорфин О-диэтилазу (одну из изоферментных форм цитохрома P-450, EROD) и другие [Wenning, Di Giulio, 1988b; Jewell, Winston, 1988; Jimenez, 1988; Livingstone et al., 1992; Livingstone et al., 1993]. Вероятно, указанные свойства и определили наибольшую устойчивость гепатопанкреаса к действию ТДТМА.

Таким образом, характер компенсационных изменений АО статуса и уровня ПОЛ у *Mytillus galloprovincialis* при действии ТДТМА имел явную тканевую

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

специфику. Наиболее выраженное действие катионный детергент оказывал на жабры моллюсков черной морфы. Это проявлялось в росте уровня ТБК-активных продуктов и повышении активности в основном ферментов низкого сродства к субстрату (СОД, каталаза). На жабры мидий коричневой морфы детергент оказывал меньшее влияние, об этом свидетельствовал постоянный уровень ПОЛ. Однако в характере изменений состояния АО комплекса отмечено сходство с моллюсками черного фенотипа. Компенсационные реакции со стороны АО ферментной системы остальных органов (нога, гепатопанкреас) на действие ТДТМА были менее выраженными. На это указывало постоянное содержание ТБК-активных продуктов и незначительные изменения в состоянии ГС.

2.5. Функциональные состояния АО ферментного комплекса тканей *M. galloprovincialis*

Представленная ранее информация позволяет заключить, что АО ферментный комплекс тканей *Mytilus galloprovincialis* реагирует на окислительную нагрузку дифференцированно. В его динамике можно выделить ряд относительно устойчивых во времени состояний, которые последовательно сменяют друг друга по мере усиления токсического эффекта. В настоящем разделе приводится описание этих состояний, и анализируются причины, лежащие в основе их возникновения.

Как отмечалось ранее, для тканей двустворок, и *M. galloprovincialis* в частности, характерна высокая интенсивность процессов ПОЛ, о чем свидетельствует повышенное содержание ТБК-активных продуктов [Winston, Di Giulio, 1991; Romeo, Gnassia-Barelli, 1997; Livingstone, 2001]. В сравнении с другими водными и наземными организмами различия достигают 2-3 порядков [Livingstone et al, 1993; Овечкина и др., 2001; Солдатов и др., 2003; Гостюхина и др., 2005].

Значительный диапазон изменения интенсивности процессов ПОЛ в тканях двустворчатых моллюсков позволяет проследить динамику АО ферментного комплекса и выявить в нем ряд устойчивых состояний, которые могут быть адекватны уровню окислительной нагрузки.

2.5.1. Глутатионовая система

Основу глутатионовой системы составляет трипептид глутатион, который может иметь самостоятельное АО значение [Кулинский, Колесниченко, 1990а; Кения и др., 1993]. Он способен инактивировать OH^\cdot , $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , гидроперекиси липидов [Кулинский, Колесниченко, 1990б], участвует в стабилизации мембран [Кулинский, Колесниченко, 1990 (а)], защите ДНК клетки [Меньшикова, Зенков, 1993]. Восстановленная форма глутатиона (GSH) используется в качестве кофактора глутатионтрансферазой (ГТ) и глутатионпероксидазой (ГП), а окисленная (GSSG) – как субстрат для глутатионредуктазы (ГР).

Анализ отношения GSH/GSSG и сопряженных с глутатионом активностей ГР и ГП в тканях *M. galloprovincialis* позволил выявить в глутатионовой системе моллюска несколько относительно устойчивых состояний, которые можно условно обозначить как низкое, умеренное и высокое напряжение.

Состояние высокого напряжения. Характеризуется низким содержанием GSH и чрезмерно высокими активностями ГП и ГР (рис. 2.22). Такое соотношение показателей свидетельствует о высокой скорости оборота глутатиона в тканях. Это состояние ГС было характерно для жабр моллюсков черной и коричневой цветовых морф (естественные популяции), а также жабр мидий коричневой морфы в период нереста [Soldatov et al., 2007].

Активность же каталазы в жабрах была низкой. Это означает, что окислительная нагрузка компенсировалась преимущественно при участии глутатионовой системы. При этом возможно два варианта нейтрализации активных форм кислорода (АФК) [Александрова и др., 2001; Soldatov et al., 2007]:

- GSH выступает в качестве кофактора ГП, а ГР обеспечивает поддержание его ресурса на минимально достаточном уровне;
- возможна реализация и самостоятельной АО функции GSH, о чем говорилось выше.

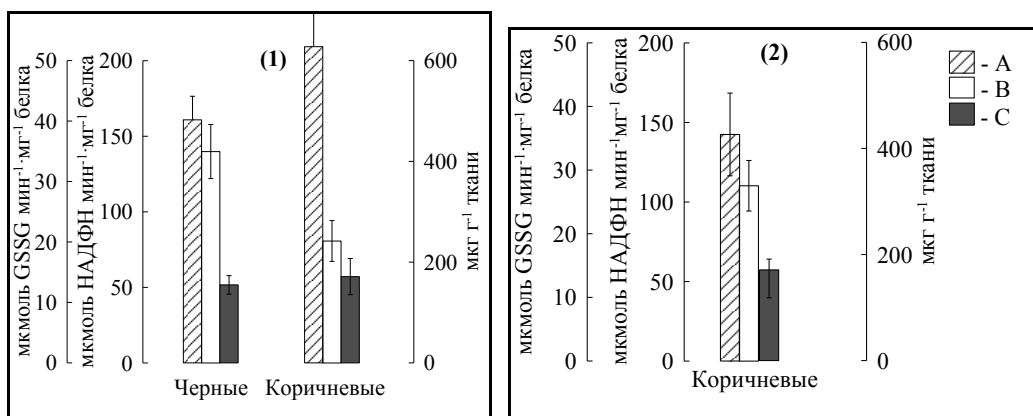


Рис. 2.22. Состояние глутатионовой системы в жабрах мидий из естественных популяций (1) и в период нереста (2) (А – активность ГП; В – активность ГР; С – уровень GSH)

Состояние умеренного напряжения. Отличается сравнительно высоким содержанием GSH в тканях, повышенной активностью ГП при относительно низкой активности ГР (рис.2.23). Такое состояние глутатионовой системы было отмечено в гепатопанкреасе черной и коричневой морф моллюска из естественных популяций [Александрова и др., 2001; Soldatov et al., 2007]. Следует отметить, что оно наблюдалось на фоне высокой активности каталазы, имеющей более низкое сродство к H_2O_2 и нейтрализующей повышенные концентрации данного соединения.

Такое соотношение процессов указывает на то, что глутатионовая система участвует в обезвреживании перекисей, но ресурс GSH при этом задействован не так активно, как в первом случае. Высокая активность ферментов низкого сродства позволяет заключить, что АО система находится в пограничном состоянии, при котором происходит переход от ведущей роли глутатионного комплекса к доминированию в АО защите каталазы, которая утилизирует более высокие концентрации H_2O_2 и гидроперекисей.

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

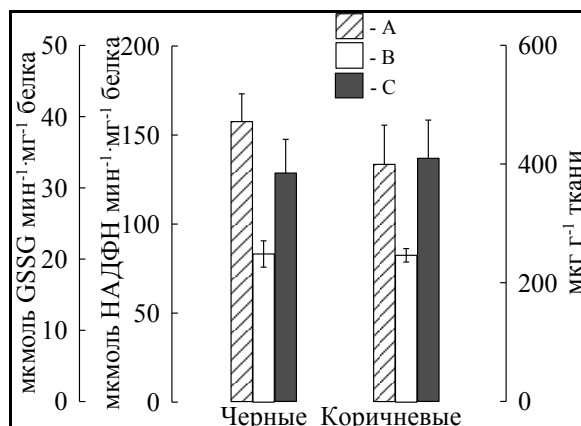


Рис. 2.23. Состояние глутатионовой системы в гепатопанкреасе моллюсков из естественных популяций (А – активность ГП; В – активность ГР; С – уровень GSH)

Состояние низкого напряжения. Характеризуется высоким содержанием GSH при относительно низкой активности сопряженных с ним ферментов, особенно ГП (рис. 2.24). Это совпадает с высокой активностью каталазы и СОД, что отражает чрезмерную продукцию гидроперекисей в тканях. Известно, что повышенный уровень H_2O_2 оказывает ингибирующее действие на активность ГП [Меньшикова, Зенков, 1993]. Данное состояние АО системы было отмечено в жабрах и ноге моллюсков черной морфы в условиях экспериментальной токсической нагрузки: введение в воду аквариума катионного детергента ТДТМА в концентрации $0,8 \text{ мг л}^{-1}$ [Солдатов и др., 2007; Soldatov et al., 2007].

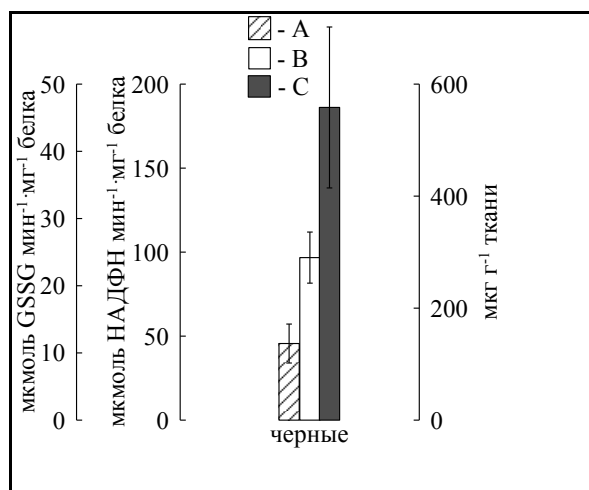


Рис. 2.24. Состояние глутатионовой системы в ноге мидий черной морфы при действии ТДТМА (А – активность ГП; В – активность ГР; С – уровень GSH)

Из представленных результатов следует, что глутатионовая система, по всей видимости, не принимает активного участия в защите ткани от действия высоких концентраций гидроперекисей. Эта функция передается каталазе и СОД. Соотношение же активности ГП и ГР позволяет говорить о наращивании в тканях

ресурса GSH, который в последующем может быть использован в нейтрализации более низких концентраций перекисных продуктов.

2.5.2. Каталаза и супероксиддисмутаза

Эта группа включает ферменты низкого сродства к субстратам, что обуславливает их доминирующую роль в инактивации высоких концентраций продуктов ПОЛ.

Функционально СОД и каталаза сопряжены, так как образующийся в реакции дисмутации H_2O_2 затем нейтрализуется каталазой. Однако в ряде случаев сопряжение не выражено, и ферменты проявляют активность самостоятельно.

Нейтрализация высоких концентраций гидроперекисей. Этот процесс осуществлялся исключительно каталазой. Активность СОД была низкой, а содержание ТБК-активных продуктов в ткани достигало 900-1400 мкмоль МДА · мг⁻¹ белка. Это состояние АО комплекса было отмечено в гепатопанкреасе моллюсков черной и коричневой морф из естественных популяций, а также в период нереста (рис. 2.25) [Александрова и др., 2002; Гостюхина и др., 2005; Солдатов и др., 2008]. Такое сочетание активностей ферментов свидетельствует об утилизации высоких концентраций гидроперекисей, образование которых не было связано с реакцией дисмутации $O_2^{\cdot-}$, катализируемой СОД.

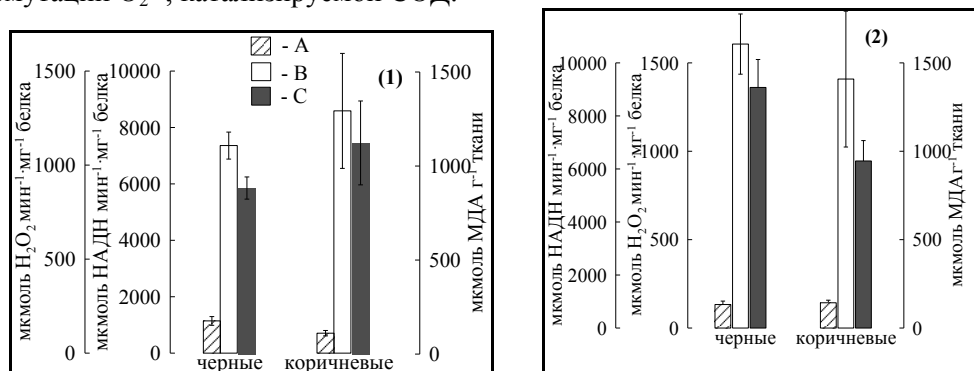
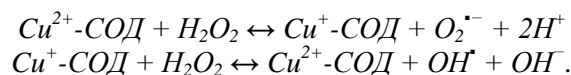


Рис. 2.25. Активность СОД и каталазы в ткани гепатопанкреаса у мидий из естественных популяций (1) и в период нереста (2) (А – СОД; В – каталаза; С – ТБК-активные продукты)

Направленная продукция СОАР. Отмечена в ноге моллюсков обеих цветовых морф из естественных популяций. В ткани регистрировалась высокая активность СОД на фоне низкой активности каталазы при умеренном содержании ТБК-активных продуктов (рис. 2.26) [Александрова и др., 2001; Гостюхина и др., 2005; Soldatov et al., 2007]. Это означает, что действие СОД скорее направлено на генерацию СОАР, нежели на его нейтрализацию. Известно, что данный фермент способен вступать во взаимодействие с H_2O_2 – продуктом дисмутации $O_2^{\cdot-}$. В результате данной реакции образуются $O_2^{\cdot-}$ и OH^{\cdot} радикал, а СОД выступает в качестве прооксиданта [Меньшикова, Зенков, 1993]:



Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

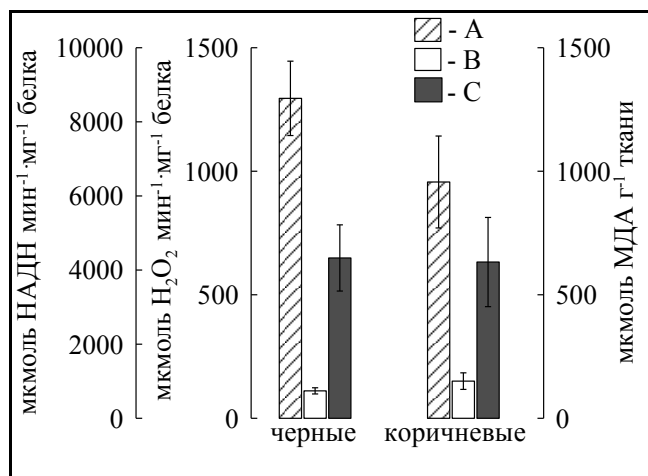


Рис. 2.26. Активность СОД и каталазы в ноге мидий из естественных популяций (А – СОД; В – каталаза; С – ТБК-АП)

Образование $O_2^{\cdot-}$ с участием СОД в ткани ноги моллюсков может быть обусловлено непосредственным участием этого радикала в процессах деполимеризации гиалуроновой кислоты, которая образуется при разрушении коллагеновых структур мышечной ткани [Дубинина, 1989; Меньшикова, Зенков, 1993; Дубинина, Шугалей, 1993]. Необходимо отметить, что основная функция ноги мидий связана с синтезом биссусных нитей [Заика и др., 1990], состоящих преимущественно из коллагеновых волокон [Qin, Waite, 1998; Coyne, Waite, 2000; Lucas et al., 2002]. В процессе жизнедеятельности моллюска происходит постоянное обновление волокон биссуса вследствие их периодического повреждения. Это сопровождается разрушением старых и синтезом новых биссусных нитей [Заика и др., 1990]. Учитывая способность $O_2^{\cdot-}$ к деполимеризации волокон коллагена, можно предположить, что этот радикал участвует в регуляции биосинтеза биссуса в ноге моллюска. По-видимому, с этим и связана высокая активность СОД в данном органе.

Случаи сопряжения активностей СОД и каталазы. Сопоставимые активности СОД и каталазы на фоне низкой интенсивности процессов ПОЛ были отмечены в жабрах *M. galloprovincialis* черного и коричневого фенотипа при действии ТДТМА (рис. 2.27) [Soldatov et al., 2007]. Активность ГП при этом была минимальна. Это означает, что токсическое действие ТДТМА было сопряжено с продукцией $O_2^{\cdot-}$, нейтрализация которого требует участия обоих ферментов.

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет заключить, что АО комплекс *M. galloprovincialis* адаптирован к функционированию в условиях окислительной нагрузки разной интенсивности. По мере увеличения уровня окислительного стресса наблюдается рост активности ГР, ГП и повышается скорость оборота GSH в тканях. Затем токсическая нагрузка компенсируется повышением активности ферментов низкого сродства к АФК – каталазы. В глутатионовой системе можно выделить несколько устойчивых состояний: низкого, умеренного и высокого напряжения. В отдельных тканях (нога) функционирование АО системы направлено, по-видимому, не на обезвреживание, а на генерацию АФК ($O_2^{\cdot-}$, СОД). АО комплекс моллюсков отличается высокой лабильностью и

чувствительностью как к физиологическим состояниям (нерест), так и к действию факторов антропогенной природы (ТДТМА). Реакции АО комплекса мидий на естественные состояния и токсическое воздействие сопоставимы, что необходимо учитывать при диагностике состояния водной среды.

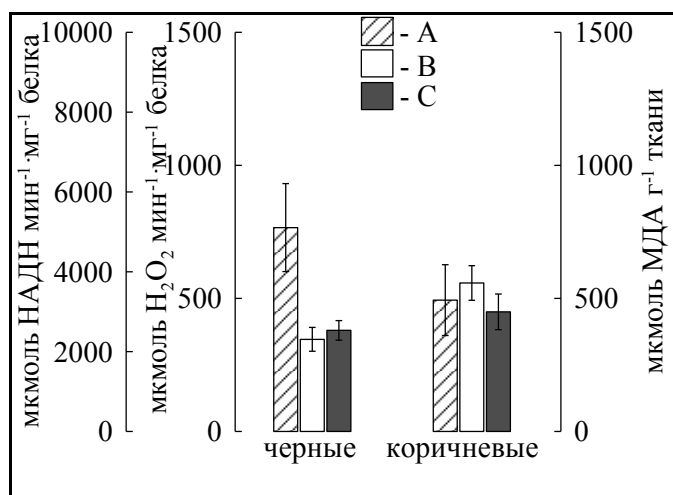


Рис. 2.27. Активность СОД и КАТ в жабрах мидий при действии ТДТМА (А – СОД; В – каталаза; С – ТБК-АП)

2.6. АО ферментный комплекс тканей *M. galoprovincialis* в биомониторинге морской среды

Показатели АО комплекса и ПОЛ моллюсков, и особенно представителей рода *Mytilus*, широко применяются в качестве биомаркеров в диагностике состояния водной среды [Di Giulio et al., 1989; Winston, Di Giulio, 1991; Sole et al., 1995; Stein et al., 1998; Руднева, 2000; Livingstone, 2001; Porte et al., 2001a; Porte et al., 2001b; Руднева, 2006]. Однако при этом исследователи не всегда учитывают модулирующее влияние на данную молекулярную систему динамики естественных абиотических факторов, физиологических состояний моллюсков и особенностей их экологических групп. Поэтому применение данных показателей в биомониторинге морской среды имеет некоторые ограничения.

Результаты данного исследования позволили выявить ряд особенностей АО комплекса и ПОЛ двустворчатых моллюсков, которые необходимо принимать во внимание при выборе АО показателей в качестве биомаркеров.

Многие исследования по биомониторингу построены на изучении АО реакций гепатопанкреаса, во многом определяющего направленность метаболизма организма [Wenning, Di Giulio, 1988b; Livingstone et al., 1992; Pellerin-Massicotte, 1994; Руднева-Титова, 1996; Araujo, 1997; Pellerin-Massicotte et al., 1997; Canesi et al., 2000]. По результатам настоящей работы, данная орган оказался наиболее чувствительным к естественному окислительному стрессу (нерест), что подтверждает рост уровня ТБК-активных продуктов и активация АО компонентов как высокого (ГС, пероксидаза), так и низкого сродства к субстрату (каталаза). В условиях же искусственной окислительной нагрузки, в отличие от нереста, состояние АО комплекса гепатопанкреаса моллюсков не претерпевало

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

существенных изменений.

К изучению жаберной ткани обращается меньшее число авторов [Regoli, Principato, 1995; Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 2000; Gravato et al., 2005]. Сравнительная оценка полученных результатов показала, что адаптационные реакции АО комплекса жабр и гепатопанкреаса в условиях окислительного стресса разной природы (нерест и действие ТДТМА) имели существенные отличия. В состоянии нереста на фоне максимального роста интенсивности ПОЛ величины всех изученных АО показателей жабр обеих морф оставались неизменными. Это свидетельствует об отсутствии реакций АО комплекса данной ткани на действие окислительного стресса, вызванного естественным физиологическим состоянием моллюска.

При действии ТДТМА жабры моллюсков обеих морф, напротив, проявили наиболее высокую чувствительность. Это выразилось в повышении уровня перекисных процессов и характере ответных реакций всех исследованных составляющих АО комплекса – ферментов высокого и низкого сродства к субстрату [Солдатов и др., 2007; Soldatov et al., 2007].

Отсюда следует, что реакции АО комплекса гепатопанкреаса и жабр моллюсков в условиях обоих типов окислительного стресса были противоположными. АО система гепатопанкреаса проявила наибольшую чувствительность к естественным состояниям моллюсков, а жабр – напротив, к влиянию антропогенной токсической нагрузки. Установленные особенности необходимо принимать во внимание при выборе и изучении параметров АО системы и ПОЛ тканей моллюсков в целях экодиагностики.

При выборе АО биомаркеров необходимо также учитывать принадлежность моллюсков к разным фенотипам, так как условия обитания могут существенно влиять на состояние организма. Подход с учетом специфики моллюсков разных экологических групп, к сожалению, редко применяется при биомониторинговых исследованиях. Например, рассмотрены особенности реакций АО комплекса моллюсков *Corbicula fluminea* из разных популяций (речная и озерная) [Vidal et al., 2002a], изучен отклик АО комплекса и ПОЛ у особой пресноводного моллюска *Unio tumidus* из разных экотопов [Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 2000].

Как показали результаты настоящего исследования, в состоянии окислительного стресса естественного и антропогенного происхождения наибольшие изменения в антиоксидантом статусе и уровне ПОЛ зарегистрированы у мидий черной морфы. Это свидетельствует о повышенной интенсивности окислительных процессов в организме моллюсков этой группы и более высокой чувствительности их тканей к действию стрессирующих факторов. Моллюски коричневой морфы, напротив, характеризовались более стабильным состоянием АО комплекса и ПОЛ по сравнению с черным фенотипом. Выявленные типы адаптационных реакций АО комплекса и ПОЛ моллюсков разных экологических групп позволяют заключить, что мидии с черной раковиной являются более приемлемыми объектами для биомониторинга в силу большей чувствительности их тканей к действию окислительного стресса [Soldatov et al., 2007].

Таким образом, при выборе параметров АО комплекса и ПОЛ моллюсков в качестве биомаркеров необходимо учитывать тканевую специфику исследуемых показателей и эколого-физиологические особенности моллюсков. Среди изученных

параметров целям экодиагностики в наибольшей степени отвечает АО система жабр мидий черной морфы, поскольку ее реакции на воздействие токсического антропогенного фактора были выражены сильнее, чем на изменение физиологического состояния моллюска. Это позволяет рекомендовать показатели АО комплекса для использования в диагностике окислительного стресса антропогенного происхождения.

2.7. АО комплекс двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Br.

Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalvis* Bruguiere, проникший в Черное море в начале 1980-х годов, в настоящее время завершил колонизацию Азово-Черноморского бассейна [Анистратенко, Халиман, 2006]. Анадара – эврибионтный морской вид, способный переносить длительное голодание, гипоксию, аноксию, условия распреснения и значительные колебания температуры [Анистратенко, Халиман, 2006; Андреевко и др., 2009; Солдатов и др., 2010]. Установлены особенности белкового и углеводного обмена в тканях *A. inaequalvis* [Головина, 2005; Андреевко и др., 2009; Солдатов и др., 2010], выявлен качественный и количественный состав каротиноидов [Бородина и др., 2009]. Необходимость исследования параметров АО комплекса и процессов ПОЛ черноморской анадары вызвана тем, что соотношение этих показателей во многом определяет адаптационные возможности организма моллюска [Livingstone, 2001; Столяр и др., 2004; Довженко, 2006; Солдатов и др., 2008; Фальфушинская и др., 2008].

2.7.1. Тканевые особенности АО комплекса *A. inaequalvis*

Исследовали половозрелых особей анадары *A. inaequalvis* с длиной раковины 30–33 мм. Моллюсков собирали в марте в районе пос. Кацевели (Южный берег Крыма), после сбора и транспортировки выдерживали в аквариумах на естественном протоке в течение 2–3 суток.

Нога. Среди исследованных тканей нога анадары характеризовалась максимальным содержанием глутатиона, наиболее высокой активностью ГП и низким уровнем ТБК-активных продуктов, низкой активностью ГР, каталазы и СОД (рис. 2.28-2.30) [Гостюхина, Головина, 2012].

Содержание восстановленного глутатиона в ноге было $871,9 \pm 176,2$ мкг г⁻¹ ткани, что выше по сравнению с жабрами и гепатопанкреасом в 2,2–4,0 раза ($p \leq 0,01$), соответственно. Активность ГП в ноге составила $21,1 \pm 2,7$ мкмоль GSSG мин⁻¹ мг⁻¹ белка, что в 2,5 раза ($p \leq 0,01$) больше, чем в гепатопанкреасе.

Высокая активность ГП и большое количество глутатиона в ноге *A. inaequalvis* предполагает значительную скорость оборота этого соединения и активное участие в процессе инактивации гидроперекисей. Низкая активность ГР в сочетании с высоким уровнем глутатиона, поддержание которого и обеспечивает данный фермент, вероятно, связана с особенностями углеводного метаболизма моллюска. Известно, что глюкоза является исходным метаболитом в пентозофосфатном пути окисления углеводов, ведущем к образованию НАДФН – энергетического эквивалента для ГР при восстановлении окисленной формы глутатиона. По сравнению с мидией уровень глюкозы в ноге анадары значительно

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

ниже [Солдатов и др., 2010], что может приводить к снижению уровня НАДФН и, как следствие, более низкой активности ГР. Возможно, у моллюска в таких условиях имеются дополнительные механизмы восстановления GSH или его синтеза *de novo* [Гостюхина, 2012].

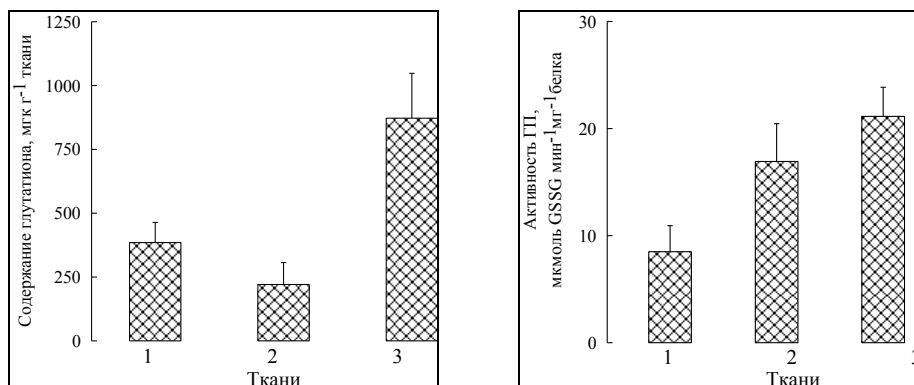


Рис. 2.28. Содержание GSH и активность ГП в тканях анадарты: 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога

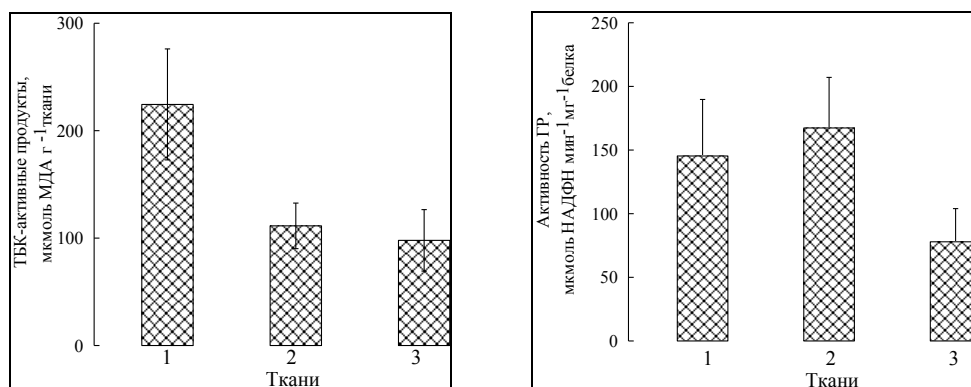


Рис. 2.29. Содержание ТБК-активных продуктов и активность ГР в тканях анадарты: 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога

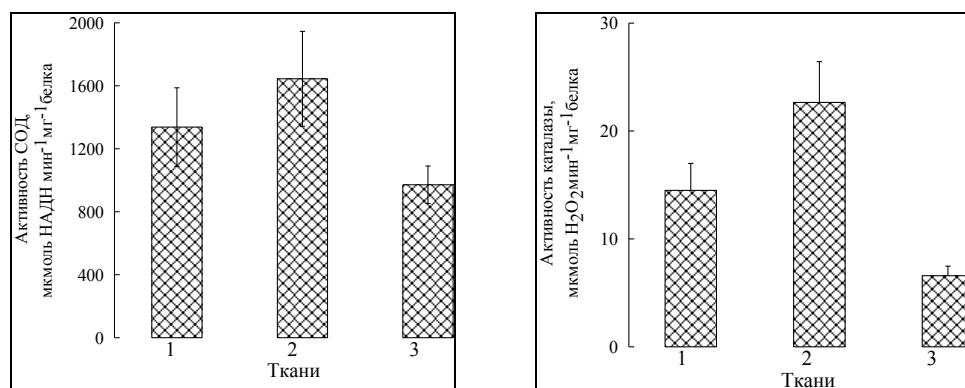


Рис. 2.30. Активность СОД и каталазы в тканях анадарты: 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога

Глава 2

Анадара – подвижный моллюск, способен активно перемещаться и зарываться в грунт [Анистратенко, Халиман, 2006]. Интенсивность метаболизма в ткани ноги анадары выше, чем у мидии [Столяр и др., 2004; Головина, 2005]. Содержание каротиноидов в ноге анадары больше, чем в гепатопанкреасе и жабрах [Бородина и др., 2009]. Кроме того, в отличие от других черноморских моллюсков, вселенец имеет эритроцитарный гемоглобин, обеспечивающий более высокую кислородную емкость его гемолимфы [Hourdez, Weber, 2005]. Вероятно, окислительная нагрузка активирует компоненты АО комплекса, в частности ГП и GSH, которые участвуют в утилизации пероксида водорода и различных гидроперекисей. Об эффективном обезвреживании этих соединений в ноге анадары свидетельствует и низкий уровень ТБК-активных продуктов. Минимальная активность СОД и каталазы позволяет предположить, что концентрация пероксида водорода и супероксидного радикала в ноге была невысока, а ведущая роль в антиоксидантной защите принадлежала глутатионовой системе (ГП, ГР, GSH).

Гепатопанкреас. Гепатопанкреас анадары выделялся высоким содержанием ТБК-активных продуктов: $224,44 \pm 51,67$ мкмоль МДА g^{-1} сырой ткани. Это превышало значения данного показателя в ноге и жабрах моллюска в 2,0–2,3 раза ($p \leq 0,05$). Активность ГР и каталазы в гепатопанкреасе была соответственно в 1,9–2,2 раза выше ($p \leq 0,05–0,01$), чем в ноге, но достоверно не отличалась от таковой в жабрах. Активность ГП была низкой. По содержанию глутатиона и активности СОД гепатопанкреас занимал промежуточное положение среди исследованных тканей [Гостюхина, Головина, 2012].

Сравнительно низкая активность ГП в гепатопанкреасе анадары наблюдалась на фоне высокой активности ГР и повышенном уровне GSH. Подобное состояние ГС свидетельствует о малоэффективной работе ГП. Возможно, в целом эта система обеспечивала накопление GSH и поддержание его резерва на достаточном уровне, необходимом для самостоятельного АО действия глутатиона [Кулинский, Колесниченко, 1990]. Основная роль в защите гепатопанкреаса, очевидно, принадлежала каталазе и СОД, проявлявших высокую активность, что согласуется и с максимальным уровнем ПОЛ. Вероятно, СОД и каталаза в гепатопанкреасе осуществляют последовательную инактивацию высоких концентраций супероксидного радикала и образующегося затем пероксида водорода, а глутатионовая система активируется на стадиях удаления низких концентраций перекисных продуктов [Гостюхина, Головина, 2012].

Повышенный уровень процессов ПОЛ в гепатопанкреасе связан с интенсивно протекающими процессами распада и синтеза белков, липидов и других соединений [Moore et al., 1988; Livingstone et al., 1992]. Доля полиненасыщенных жирных кислот – преимущественных субстратов ПОЛ – в составе жирных кислот гепатопанкреаса достигает 70 % [Ribera et al., 1989; Livingstone et al., 1992]. В нем установлен высокий уровень эндогенной генерации активных форм кислорода (АФК) [Lemaire, Livingstone, 1993], постоянно происходит трансформация и детоксикация веществ, а также атрофия и разрушение гепатоцитов в результате повреждающего действия ксенобиотиков [Winston et al., 1990; Livingstone et al., 1992]. Аккумулируя последние, гепатопанкреас сохраняет способность к полноценному функционированию. Для него характерна эффективная АО защита [Winston et al., 1990; Livingstone et al., 1992; Gamble et al., 1995] и высокая активность ферментов биотрансформации, которые предохраняют

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

АО ферменты от окислительной деструкции [Birmelin, 1999]. В гепатопанкреасе содержится много каротиноидов [Поспелова, Нехорошев, 2003; Довженко, 2006; Бородина и др., 2009], которые дополняют функционирование ферментативного звена АО системы.

Величина исследованных АО показателей гепатопанкреаса анадары была средней или минимальной по сравнению с жабрами и ногой при максимальной интенсивности ПОЛ. Аналогичная картина установлена по общему содержанию каротиноидов в тканях анадары [Бородина и др., 2009], активности ферментов углеводного и белкового обмена [Головина, 2005]. Напротив, у мидии *M. galloprovincialis* [Солдатов и др., 2008] величины большинства АО параметров в гепатопанкреасе по сравнению с другими тканями были наибольшими на фоне высокого уровня ПОЛ. Содержание каротиноидов в гепатопанкреасе мидии *M. galloprovincialis* в десятки раз больше, чем в гонадах и жабрах этого вида, а также, чем в гепатопанкреасе анадары *Anadara inaequalis* [Поспелова, Нехорошев, 2003; Бородина и др., 2009]. У митилид и устриц (*Crenomytilus grayanus*, *Crassostrea gigas*, *Modiolus kurilensis*, *Glycymeris yessoensis*) уровень GSH и каротиноидов значительно выше, чем в гепатопанкреасе анадары *A. broughtonii* и *A. boucardi*, а активность каталазы в гепатопанкреасе *C. grayanus* – в 7,5–12 раз превышала активность фермента обоих видов анадары [Довженко, 2006].

Жабры. АО комплекс жабр анадары характеризовался максимальной активностью ГР, каталазы и СОД, достоверно большей по сравнению с ногой в 1,7–3,4 ($p \leq 0,05$ – $0,001$). Активность ГП была незначительно ниже, чем в ноге, но в 2 раза выше ($p \leq 0,05$), чем в гепатопанкреасе. Содержание GSH в жабрах было наименьшим [Гостюхина, Головина, 2012].

Значения показателей глутатионовой системы позволяют заключить, что глутатион активно задействован в работе ГП, а ГР обеспечивает постоянное возобновление его ресурса [Кулинский, Колесниченко, 1990]. Низкий уровень глутатиона свидетельствует о превышении скорости его утилизации над скоростью ресинтеза, что может приводить к исчерпанию его запаса. Возможно, это компенсируется повышенной активностью каталазы и СОД в жабрах анадары. Интенсивно аэрируемая ткань жабр имеет тонкий водно-гематический барьер, высокий уровень продукции АФК [Lemaire, Livingstone, 1993; Livingstone, 2001], с участием которых протекают процессы регенерации поврежденных жаберных филламентов [Moore et al., 1988].

АО комплекс жабр анадары отличается высокой активностью большинства исследованных ферментов, в то время как у митилид и гребешка максимальные величины параметров АО системы характерны для гепатопанкреаса [Gamble et al., 1995; Довженко, 2006; Солдатов и др., 2008]. По нашим данным, содержание ТБК-активных продуктов в тканях анадары вдвое ниже, чем у мидии, хотя уровень ПОЛ у обоих видов понижался в ряду гепатопанкреас > жабры > нога [Гостюхина, Головина, 2012; Гостюхина, Головина, 2013].

Таким образом, изучена тканевая специфика показателей антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов черноморского двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis*. Градация тканей по исследованным показателям была следующей:

- по активности ГР, каталазы и СОД: жабры > гепатопанкреас > нога;
- по активности ГП: нога > жабры > гепатопанкреас;

Глава 2

- по содержанию глутатиона: нога > гепатопанкреас > жабры;
- по уровню ТБК-активных продуктов: гепатопанкреас > жабры > нога.

Наибольшая активность глутатионпероксидазы и высокое содержание глутатиона при низком уровне ТБК-активных продуктов установлено в ноге анадары. В гепатопанкреасе моллюска наблюдалась максимальная интенсивность ПОЛ и более высокая по сравнению с ногой активность глутатионредуктазы, каталазы и супероксиддисмутазы. Среди исследованных тканей жабры имели максимальную активность большинства ферментов АО системы и самое низкое содержание глутатиона.

Установленные физиолого-биохимические особенности АО защиты тканей анадары, наряду с высокой подвижностью моллюска и наличием гемоглобина, расширяют адаптационные возможности вида и позволяют успешно осваивать новые биотопы.

2.7.2. Сравнительный анализ состояния АО комплекса тканей мидии *M. galloprovincialis*, анадары *A. inaequalvis* и устрицы *C. gigas*

Проведен сравнительный анализ показателей АО системы и ПОЛ в тканях трех видов двусторчатых моллюсков – объектов мариккультуры на Черном море: аборигенного вида мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), вселенца анадары *Anadara inaequalvis* (Bruguière, 1789) и интродуцента устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Половозрелых особей мидии, анадары и устрицы собрали весной в районе Южного берега Крыма, после транспортировки выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2–3 суток.

Наибольший уровень ПОЛ обнаружен у мидии – содержание ТБК-активных продуктов во всех тканях этого вида в 2,0–2,3 раза больше, чем у анадары ($p \leq 0,05$), и в 3,0–3,5 раза выше ($p \leq 0,001$), чем в гепатопанкреасе и жабрах устрицы. Уровень ПОЛ в мышечной ткани устрицы достоверно не отличался от отмеченного у мидии и анадары. В тканях мидии и анадары содержание ТБК-активных продуктов уменьшалось в ряду гепатопанкреас > жабры \geq нога. Интенсивность ПОЛ в тканях устрицы не имела выраженной градации [Гостюхина, Головина, 2013] (рис. 2.31).

Среди исследованных видов моллюсков анадара отличается наличием эритроцитарного гемоглобина и наименьшей чувствительностью к изменению концентрации кислорода [Довженко, 2006; Irato et al., 2007; Солдатов и др., 2010]. Предполагают, что гемоглобин оказывает непосредственное влияние на АО активность тканей этих животных, так как его сульфгидрильные (-SH) группы могут инактивировать АФК, образующиеся при гипоксии [Storey, Storey, 2000]. Вероятно, SH-группы гемоглобина анадары, наряду с глутатионом, обезвреживают АФК, что снижает интенсивность ПОЛ в тканях моллюска.

Анадара, в отличие от мидии и устрицы, ведущих прикрепленный образ жизни, может активно перемещаться по дну и зарываться в грунт. Ткани моллюска ярко окрашены и содержат больше каротиноидов, чем у мидии [Бородина и др., 2009; Гостюхина и др., 2012]. Способность каротиноидов и гемоглобина запасать кислород [Hourdez, Weber, 2005], вероятно, приводит к понижению интенсивности ПОЛ. Кроме того, повышенный обмен веществ в тканях подвижной анадары

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

[Головина, 2005] может способствовать более стабильному соотношению уровня ПОЛ и АО активности, чем у других исследованных видов.

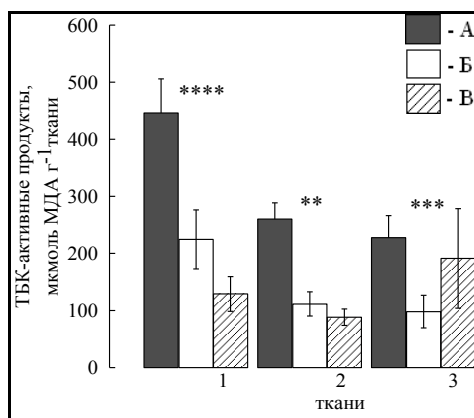


Рис. 2.31. Содержание ТБК-активных продуктов в тканях мидии (А), анадары (Б) и устрицы (В): 1 – гепатопанкреас; 2 – жабры; 3 – мышечная ткань (* - между мидией и анадарой; ** - между мидией и устрицей; *** - между анадарой и другим моллюсками; **** - между устрицей и другими моллюсками)

Состояние нереста также оказывает существенное влияние на АО активность и ПОЛ в тканях моллюсков [Viarengo et al., 1991; Niyogi et al., 2001]. У мидии в период нереста происходит активация ПОЛ и ряда АО ферментов [Солдатов и др., 2008]. АФК принимают участие в регуляции репродуктивных циклов у моллюсков и активно генерируются в этот период [Storey, Storey, 2000]. Массовый нерест у мидии происходит в марте при температуре воды +7–8°C, когда и были собраны исследованные нами моллюски. Устрица – более теплолюбивый вид, нерестится позднее при температуре воды не менее 18°C [Холодов др., 2010]. Вымет половых продуктов у анадары происходит одновременно в августе–сентябре [Чикина и др., 2003]. Принимая во внимание сроки нереста моллюсков, можно предположить, что высокий уровень продуктов ПОЛ в марте у мидии, по сравнению с устрицей и анадарой, обусловлен влиянием нерестового состояния [Гостюхина, Головина, 2013].

Наименьшему уровню ПОЛ в большинстве тканей устрицы соответствует и минимальная активность АО ферментов (рис. 2.32, 2.33). Это свидетельствует о большем защитном АО потенциале устрицы по сравнению с мидией и анадарой. В частности, устрица менее чувствительна, чем мидия, к окислительному стрессу и лучше адаптирована к загрязнению металлами [Funes et al., 2006]. По-видимому, она имеет более сбалансированное соотношение АО активности с уровнем ПОЛ.

Большинство показателей АО комплекса (активность СОД, каталазы и ГП) в тканях устрицы по сравнению с мидией и анадарой были ниже в 1,8–7,1 раза ($p \leq 0,05$ – $0,001$) (рис. 2.32, 2.33). Исключение составила активность ГР, которая была в 2,6–3,6 раза выше ($p \leq 0,05$ – $0,001$), чем у других видов моллюсков (рис. 2.33).

В мышечной ткани анадары отмечена максимальная активность ГП, в 1,8–2,0 раза выше ($p \leq 0,05$), чем у устрицы и мидии (рис. 2.33) и наибольший уровень GSH, в 3,9 раза более высокий ($p \leq 0,05$) по сравнению с мидией (рис. 2.34) [Гостюхина, Головина, 2013]. Содержание GSH в тканях устрицы не определяли.

Глава 2

Установленное нами соотношение активности глутатионовых ферментов и уровня GSH у анадары предполагает высокую скорость оборота GSH [Гостюхина, 2012]. Следовательно, глутатионовая система, эффективно инактивируя пероксид водорода в ноге моллюска [Кулинский, Колесниченко, 2009], играет значительную роль в работе АО комплекса. Вероятно, глутатион не только участвует в указанных реакциях, но и накапливается в клетке, что связано с его способностью неферментативно обезвреживать АФК [Кения и др., 1993; Кулинский, Колесниченко, 2009]. Это согласуется и с низким уровнем ПОЛ в мышечной ткани анадары по сравнению с другими исследованными видами [Гостюхина, Головина, 2013] (рис. 2.31).

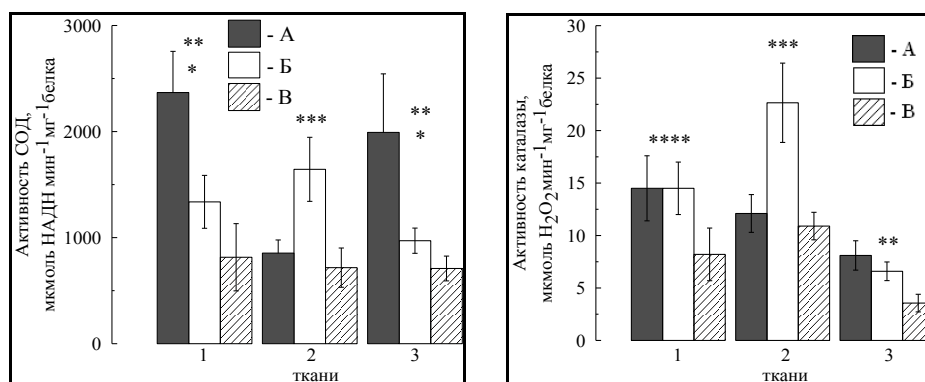


Рис. 2.32. Активность СОД и каталазы в тканях мидии (А), анадары (Б) и устрицы (В): 1 – гепатопанкреас; 2 – жабры; 3 – мышечная ткань (* - между мидией и анадарой; ** - между мидией и устрицей; *** - между анадарой и другим моллюсками; **** - между устрицей и другими моллюсками)

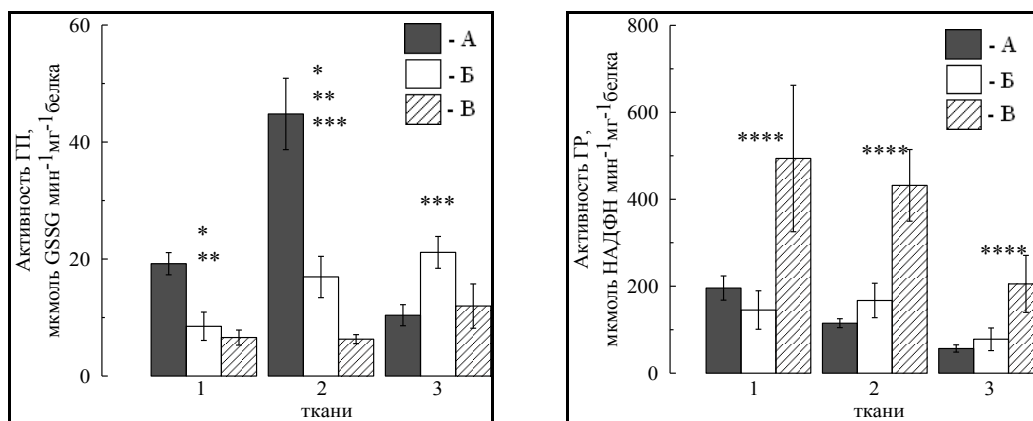


Рис. 2.33. Активность ГП и ГР в тканях (А), анадары (Б) и устрицы (В): 1 – гепатопанкреас; 2 – жабры; 3 – мышечная ткань (* - между мидией и анадарой; ** - между мидией и устрицей; *** - между анадарой и другим моллюсками; **** - между устрицей и другими моллюсками)

Высокий резерв глутатиона в ноге у анадары, возможно, обусловлен приспособлением моллюска к обитанию в условиях низкого содержания кислорода

Антиоксидантный ферментный комплекс тканей черноморских...

в среде. В тканях анадары наблюдается повышенный уровень свободных аминокислот [Солдатов и др., 2010], донором которых в гипоксических условиях может служить GSH [Кулинский, Колесниченко, 2009]. Более низкая активность ГП и уровень GSH в ноге мидии по сравнению с анадарой свидетельствует о меньшей эффективности ГС у первой [Гостюхина, 2012].

Активность каталазы и СОД в мышечной ткани трех исследованных видов моллюсков понижалась в ряду: мидия–анадара–устрица. Достоверно более высокая активность СОД у мидии ($p \leq 0,05$), возможно, связана с тем, что для прикрепления к субстрату моллюск использует биссусную нить, которая продуцируется железой, находящейся в основании ноги. Состоящие из коллагена биссусные нити постоянно обновляются [Lucas et al., 2002], в разрушении коллагеновых волокон принимает участие супероксидный анион-радикал (СОАР), трансформацию которого осуществляет СОД [Меньшикова, Зенков, 1993].

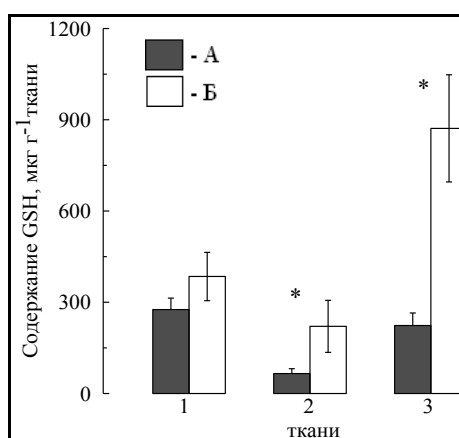


Рис. 2.34. Содержание GSH в тканях мидии (А) и анадары (Б): 1 – гепатопанкреас; 2 – жабры; 3 – мышечная ткань (* - между мидией и анадарой; ** - между мидией и устрицей; *** - между анадарой и другими моллюсками; **** - между устрицей и другими моллюсками)

Установлены видовые различия по активности ГП в жабрах моллюсков (рис. 2.33). Максимальная активность фермента обнаружена в жабрах мидии, что больше, чем у анадары и устрицы соответственно в 2,6–7,1 раза ($p \leq 0,001$). При высокой активности ГП мидия имеет небольшой ресурс GSH, что определяет высокую скорость оборота этого тиола и его активную роль в поддержании работы ГП по расщеплению перекисных соединений. Средние величины активности ГП, ГР и более высокий уровень GSH в жабрах анадары предполагают наиболее сбалансированное соотношение элементов ГС. В жабрах устрицы ГС, вероятно, функционировала менее эффективно, поскольку низкая активность ГП сопровождалась высокой активностью ГР [Гостюхина, 2012; Гостюхина, Головина, 2013].

В жабрах анадары активность ключевых АО ферментов – СОД и каталазы, была в 1,9–2,3 раза выше ($p \leq 0,05$), чем у мидии и устрицы, что подтверждает особый АО статус гемоглобинсодержащего моллюска (рис. 2.32). Различий в активности СОД и каталазы в жабрах мидии и устрицы не установлено.

Глава 2

При аноксии и гипоксии происходит рост интенсивности ПОЛ и компенсаторная активация ряда АО ферментов, в том числе СОД [Storey, Storey, 2000]. Очевидно, жабры анадары испытывают большую окислительную нагрузку, моллюск устойчив к гипоксии благодаря наличию каротиноидов и гемоглобина [Hourdez, Weber, 2005]. Интенсивность потребления кислорода вселенцем даже в условиях нормоксии в 6–7 раз меньше по сравнению с характерной для черноморской фауны мидией *Mytilus galloprovincialis* Lam. [Солдатов и др., 2010]. Повышенная активность СОД является соответствующим адаптивным механизмом против постгипоксического роста ПОЛ [Storey, Storey, 2000]. Вероятно, СОД и каталаза обеспечивают основную защиту жабр анадары, тем более что активность ГП в этой ткани существенно ниже по сравнению с мидией [Гостюхина, Головина, 2013].

В гепатопанкреасе мидии активность ГП и СОД была в два-три раза выше ($p \leq 0,05-0,01$), чем у анадары и устрицы, активность каталазы у мидии и анадары была одинаково высока и больше, чем у устрицы в 1,7 раза ($p \leq 0,05$). Повышенная активность ГП и СОД и более высокий уровень ПОЛ в гепатопанкреасе мидии по сравнению с анадарой и устрицей, по-видимому, свидетельствует об активации различных звеньев АО системы в ответ на возрастающую окислительную нагрузку в период нереста. По активности ГП, СОД и каталазы устрица уступала двум другим видам в большинстве исследованных тканей [Гостюхина, Головина, 2013].

Таким образом, наибольшую окислительную нагрузку испытывали ткани мидии, имевшие в большинстве случаев максимальные величины АО показателей и самый высокий уровень ПОЛ. Среди исследованных тканей мидии основная роль в антиоксидантной защите принадлежит гепатопанкреасу, у анадары в этом процессе значительное участие принимают также жабры и нога. Активность ключевых АО ферментов – СОД и каталазы, в жабрах гемоглобинсодержащей анадары была вдвое выше, чем у мидии и устрицы. Уровень окислительной нагрузки в тканях анадары, в целом, был меньше, чем у мидии, но больше, чем у устрицы. В большинстве тканей устрицы установлены низкие величины исследованных показателей, за исключением ГР, активность которой была в несколько раз выше, чем у других моллюсков. Степень участия в антиоксидантной защите различных тканей устрицы практически одинакова.

Из представленных результатов следует, что организм мидий, в сравнении с другими массовыми видами двустворчатых моллюсков, более чувствителен к условиям окружающей среды. Это позволяет рассматривать его как наиболее перспективный объект для целей биоиндикации морских акваторий черноморского региона.

Глава 3

КАРОТИНОИДЫ ТКАНЕЙ МАССОВЫХ ВИДОВ ЧЕРНОМОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ

Каротиноиды – крайне разнообразная, широкораспространенная в природе группа пигментов, выполняющая значительный спектр биологических функций. К 2004 году она насчитывала около 750 соединений [Maoka, 2009]. В результате новейших исследований в области изучения химической структуры этих молекул и их биологических свойств особый интерес стал проявляться к каротиноидам морского генезиса [Liaaen-Jensen, 1991; 1998].

Каротиноиды морского происхождения имеют более разнообразную и сложную структуру молекул [Maoka, 2009]. За разнообразием структуры этих соединений стоит и более широкий спектр функций. У морских организмов каротиноиды являются не только компонентами фотосинтетических протеиновых комплексов [Britton, 1995], но и, благодаря наличию богатых электронами двойных сопряженных связей, они обладают выраженной реакционной способностью к перехвату свободных радикалов [Britton, 1995]. Это обусловило их успешное применение в современной медицине как хемопрофилактических и цитостатических средств при лечении раковых, сердечно-сосудистых заболеваний, коррекции процессов обмена веществ [Hashimoto, 2009].

Особый интерес представляют процессы переноса каротиноидов в трофических цепях морских экосистем. Они предполагают не только аккумуляцию пигментов растительного происхождения в тканях консументов, но и их значительную метаболическую трансформацию. В этой связи интересны представители типа Mollusca, которые проявляют выраженную устойчивость к окислительной нагрузке [Солдатов и др., 2003; 2008]. Показано, что ткани моллюсков располагают достаточно широким спектром процессов, направленных на преобразование каротиноидов, получаемых с пищей [Britton et al., 1998]. В этой связи изучение трофической цепи «фитопланктон → моллюски-фильтраторы → моллюски-хищники» представляет особый интерес, так как именно здесь происходит преобразование растительных каротиноидов, за которым стоит понимание функциональной целесообразности содержания данной группы соединений в тканях животных.

Информация же о составе каротиноидов тканей черноморских двустворчатых и брюхоногих моллюсков крайне ограничена. При помощи метода тонкослойной хроматографии и спектрального анализа (UV-VIS спектры), имеющих ограниченную разрешающую способность, предварительно изучен только доминирующий состав данной группы пигментов у *Mytilus galloprovincialis* [Поспелова, Нехорошев, 2003]. В основном же преобладают сведения о суммарном содержании каротиноидов [Поспелова, 2008].

В настоящей работе на основе комплекса современных методов исследования: тонкослойной (ТСХ), колоночной (КХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографий (HPLC), качественных реакций на присутствие химических групп, спектрального анализа в UV-VIS диапазоне, масс-спектрометрии (FAB MS) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса

($^1\text{H-NMR}$) впервые проведена подробная идентификация качественного состава каротиноидов тканей массовых видов черноморских моллюсков с учетом особенностей их экологии и функционального состояния.

3.1. Каротиноиды морского происхождения

В настоящем разделе дается краткая справка относительно истории изучения каротиноидов, рассматриваются вопросы их классификации и хемосистематики. Особое внимание уделяется каротиноидам морского происхождения, их свойствам и функциям в организме гидробионтов. Приводится информация о содержании и качественном составе каротиноидов у планктонных микроводорослей, двустворчатых моллюсков-фильтраторов и хищных видов брюхоногих моллюсков. Рассматриваются метаболические пути трансформации этой группы соединений в трофической цепи: фитопланктон \rightarrow моллюски-фильтраторы \rightarrow хищники.

3.1.1. Исследования каротиноидов (общие положения)

Благодаря совершенствованию методов физико-химического анализа, за последние 15 лет удалось не только открыть сотни новых каротиноидов, но и усовершенствовать их химическую классификацию и хемосистематику, а также получить представление о метаболических путях трансформации этой группы соединений в организмах и экосистемах [Liaaen-Jensen 1998; Пиневиц, Аверина, 2002; Britton et al, 1998, 2008; Маока, 2009, 2011;].

История вопроса. Первоначальные сведения о каротиноидах носили крайне общий характер. Первые упоминания относятся к началу XIX века, когда Генрих Вакенродер открыл в моркови ярко-красные кристаллы пигмента и назвал их «каротином» (от латинского «карота» – морковь) [Бриттон, 1986; Карнаухов, 1988]. Однако в зарубежной и в отечественной литературе основоположником исследований каротиноидов как химических соединений считается М.С. Цвет [Карнаухов, 1988; Britton et al., 1995]. Он разработал метод адсорбционной колоночной хроматографии, который позволил разделять растительные пигменты. После нескольких лет работы на основании спектроскопических и химических характеристик этой группы соединений он предложил название для этих пигментов – каротиноиды. Позже Р.М. Вильштеттером (Willstatter) были определены и установлены химические формулы каротина (углеводородный каротиноид) и ксантофилла (кислородосодержащий каротиноид) [Бриттон, 1986; Карнаухов, 1988]. Следствием этой работы явилось то, что в химической номенклатуре каротиноидов появилось разделение их на каротины и ксантофиллы. Впоследствии Л. Цихмейстер в 1934 году ввел понятие о полиеновой структуре каротиноидов [Бриттон, 1986; Britton et al., 1995].

Большой вклад в изучение каротиноидов был внесен школами П. Карера и Р. Куна: открытие провитамина А, как части молекулы β -каротина [Kriskey, 1994; Britton et al., 1995]. К 1948 году количество описанных каротиноидов с известной структурой составило 28 и 37 с частично установленной или неизвестной структурой [Карнаухов, 1988]. Были также описаны пути синтеза нескольких C_{40} -каротиноидов [Бриттон, 1986; Britton et al., 1995]. В 1950 году удалось показать, что

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

ксантофиллы могут содержать не только гидроксильные, но и кето- и эпокси- группы [Бриттон, 1986; Britton et al., 1995].

С развитием физико-химических методов исследования, таких как ИК-спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, дифракция рентгеновского излучения, круговой дихроизм, масспектроскопия произошел новый виток в изучении каротиноидов. Стали говорить не только о C_{40} -каротиноидах, но также о C_{45} -, C_{50} -каротиноидах, норкаротиноидах и производных гликозидов и метилкетонов [Britton et al., 1995]. Удалось показать, что помимо полиеновых связей у каротиноидов в основной цепи могут присутствовать алленовые и ацетиленовые связи [Britton et al., 1995]. В результате к середине 70-х годов было описано около 300 каротиноидов, а к 2004 году было зарегистрировано уже 750 соединений данного ряда [Britton et al., 2008; Маока, 2009].

Классификация каротиноидов. Анализ химического состава, структуры и свойств каротиноидов позволил предложить классификацию этой группы соединений [Britton et al., 1995]. Как известно, каротиноиды относятся к тетратерпенам (или их производным), основу молекул которых составляют повторяющиеся C_5 -изопреновые фрагменты. Скелет молекулы образован цепью сопряженных двойных связей (от 3 до 12 фрагментов), на концах которых могут образовываться пяти- шести-членные циклы, а также другие химически активные группы [Бриттон, 1986; Liaaen-Jensen, 1998]. Наиболее широко известна классификация каротиноидов по содержанию основных элементов (водород, углерод и кислород), которая делит эту группу соединений на каротины и ксантофиллы. В основу классификации последних положены следующие принципы:

- по составу концевых фрагментов молекул различают: окси-, оксо-, эпокси- каротиноиды, альдегиды и эфиры каротиноидов и др;
- по длине основного углеродного скелета (C_{37} , C_{40} , C_{45} и C_{50}): нор-, секо-, апокаротиноиды и др.

В настоящее время известно более 750 каротиноидов, среди которых было выделено 178 соединений, не вписывающихся в известную систему классификации [Sliwka, 2012]. Норвежскими исследователями в 2012 году была предложена новая классификационная схема, в соответствии с которой каротиноиды делятся на каротины (содержащие в своем составе только углерод и водород) и гетерокаротиноиды. Последние подразделяются на ряд самостоятельных групп в зависимости от содержания дополнительных группировок: кислородосодержащих, серосодержащих, азотосодержащих и т.п. [Sliwka, 2012].

С помощью методов 1H -NMR, кругового дихроизма и рентгеноструктурного анализа было показано, что каротиноиды имеют сложную пространственную структуру и обладают хиральностью. Среди них широко представлены изомеры [Britton et al., 2008].

Хемосистематика каротиноидов. Хемосистематика – особое направление в изучении каротиноидов, которое определяет связи между химической структурой и биологическим происхождением соединений каротиноидного ряда. О наличии данной зависимости свидетельствуют исследования норвежских ученых [Liaaen-Jensen, 1998]. Им удалось показать, что наиболее разнообразными по химической структуре являются каротиноиды микроводорослей и представителей царства животных (преимущественно морские организмы). У них было обнаружено 10

основных групп каротиноидов, различных по своей структуре: С₄₀-каротиноиды, апокаротиноиды, норкаротиноиды, СН₃-окисленные каротиноиды, гликозид-каротиноиды, ацетиленовые каротиноиды, эпокси-каротиноиды, алленовые каротиноиды, ацетат-каротиноиды, эфиры каротиноидов разнообразные по строению, составу и наличию химических групп [Britton et al., 1995, 2008].

Представители остальных таксонов: бактерии, высшие растения, дрожжи, грибы, содержат только от 3 до 5 групп различных по структуре каротиноидов [Liaaen-Jensen, 1998; Britton et al., 1995, 2008]. Результаты сравнительных исследований качественного состава соединений каротиноидного ряда показали значительно большее разнообразие их у морских организмов, что и определило приоритет изучения этой группы биообъектов.

Функции каротиноидов. К наиболее известным функциям каротиноидов относят передачу энергии при фотосинтезе, фотозащиту, регуляцию репродуктивных свойств организма и активности ряда ферментов, участие в метаболизме витаминов, гормона роста, подавление окислительных процессов в тканях и др. [Бриттон, 1986; Britton et al., 1995; Поляков, Лешина, 2006].

Функциональные свойства каротиноидов определяются особенностями строения их молекул. Они имеют длинную систему сопряженных двойных связей, которая поглощает свет в видимой части электромагнитного спектра (400-500 нм) [Карнаухов, 1988; Britton, 1995; Поляков, Лешина, 2006]. Липофильная природа каротиноидов и особенности структуры углеродного скелета молекулы позволяют им взаимодействовать с двойным слоем липидов мембран и формировать фотосинтетические протеиновые комплексы [Britton, 1995; Поляков, Лешина, 2006]. Поглощая свет и передавая энергию возбуждения на хлорофиллы, каротиноиды расширяют диапазон собираемых длин волн света и улучшают эффективность фотосинтеза [Бриттон, 1986; Карнаухов, 1988; Britton, 1995].

С появлением аэробной среды у организмов появилась угроза не только избытка света, но и негативной комбинации света и кислорода. Каротиноиды, благодаря наличию богатых электронами двойных сопряженных связей, обладают большой реакционной способностью к перехвату свободных радикалов. Это дает им способность защитить другие чувствительные молекулярные системы от окислительного повреждения [Бриттон, 1986; Карнаухов, 1988; Britton, 1995]. Они предотвращают процессы фотоокисления, обеспечивают эффективную защиту против образования и действия синглетного кислорода [Krisky, 1994; Del Campo et al., 2000; Пиневиц, Аверина, 2002].

Однако во многом свойства и функции каротиноидов остаются неясными [Krisky, 1994; Britton et al., 1995]. Аккумуляция и метаболизм данной группы соединений в значительной степени зависит от спектра питания организма и не всегда определяется функциональной целесообразностью их присутствия в тканях [Britton et al., 1995].

3.1.2. Каротиноиды морского происхождения

В результате новейших исследований в области изучения химической структуры каротиноидов и их биологических свойств особый интерес стал проявляться к изучению каротиноидов морского генезиса [Hans, 1981; Liaaen-Jensen, 1990; 1991; Britton et al., 1995; Shimidzu et al., 1996]. Разделение этих

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

соединений на наземные и морские группы появилось лишь в конце 90-х годов, в связи с результатами исследований в области их хемосистематики, номенклатуры и биологических свойств [Kriskey, 1994; Liaaen-Jensen, 1989; 1998].

Особенности состава, свойств и функций каротиноидов морского генезиса. Открытие большого количества каротиноидов (750 природных соединений), преимущественно в морских организмах, помогло существенно продвинуть изучение биологических свойств этой группы соединений.

Каротиноиды морского происхождения имеют более разнообразные и сложные структуры. У морских бактерий основными являются C_{45} -, C_{50} -каротиноиды в цис-изомерном виде [Liaaen-Jensen, 1998], у морских водорослей преобладают алленовые и ацетиленовые каротиноиды с различными окси-, эпокси-, гидроксигруппами, а также цис- и транс-изомерией молекул и хиральностью центров [Britton et al., 1995; Liaaen-Jensen, 1998].

Среди морских каротиноидов с большим содержанием различных химических групп и наличием алленовой и ацетиленовой связей особое место занимают фукоксантин, перидинин, астаксантин, неоксантин. Известно влияние фукоксантина и неоксантина на усиление обменных процессов в организме и снижение содержания глюкозы в крови [Hashimoto, 2009]. Каротиноиды морского происхождения являются лидерами среди ингибиторов перекисного окисления липидов, вызываемого активными формами кислорода [Miki, 1991; Shimidzu et al., 1996].

Спектр функций каротиноидов у гидробионтов более широк в сравнении с аналогичными соединениями наземных форм жизни, что, возможно, связано с условиями существования их в водной среде, в которой, в отличие от воздуха, растворенные химические соединения оказывают прямой эффект на организм (токсический, коммуникационный и т.д.) [Tsushima, 1995; Shimidzu et al., 1996]. У морских организмов каротиноиды выполняют функцию фотопротекции, являются источником кислорода, оказывают защитное действие (ацетиленовые каротиноиды) [Liaaen-Jensen, 1990; Britton et al., 1995]. Кетокаротиноиды, образующиеся у некоторых микроводорослей и накапливающиеся у ряда моллюсков и рыб, определяют не только окраску их тела, но и отличаются более высокой антиоксидантной активностью и противораковыми свойствами [Mercadante, 1999].

Несмотря на широкую распространенность каротиноидов в природе, информация о путях их биосинтеза и метаболизма все еще неполная, и это направление исследований представляет определенный научный интерес [Britton et al., 1995].

Перспективы использования и приоритет исследований каротиноидов морского происхождения. Многие каротиноиды морского происхождения используются в качестве хемопрофилактических средств при лечении разных стадий раковых заболеваний и проявляют явные антиоксидантные или прооксидантные свойства [Hashimoto, 2009]. Так, фукоксантин подавляет развитие у человека клеток нейробластомы GOTO [Schagerl et al., 2003; Rico-Villa et al., 2006; Фильченков и др., 2008]. На протяжении многих лет изучается антиканцерогенное действие фукоксантина, неоксантина и галацантиноксантина при лейкемии, раке простаты, молочной железы, прямой кишки, кожи. Известны результаты по успешному лечению фукоксантином рака двенадцатиперстной кишки у мышей [Kotake-Nara et al., 2005; Hosokawa et al., 2006; Kumar et al., 2008; Hashimoto, 2009].

Цитостатические свойства многих морских каротиноидов определены по отношению к раковым заболеваниям различной этиологии, и это направление применения каротиноидов является наиболее перспективным [Kotake-Nara et al., 2001; Фильченков и др., 2008; Hashimoto, 2009].

Перспективы использования каротиноидов в медицине связаны не только с их антиканцерогенными свойствами, но и с их способностью влиять на обменные процессы. Так, фукоксантин нашел применение при лечении ожирения и сахарного диабета [Maeda et al., 2007]. Известны работы ученых, посвященные использованию каротиноидов при лечении коронарной недостаточности сердечной мышцы. Лекарственные препараты на основе лютеина и зеаксантина применяются при лечении и профилактике глазных болезней [Krisky, 1994; Hashimoto, 2009]. Каждый каротиноид обладает в большей или меньшей степени антиоксидантной активностью и является самостоятельным объектом исследований в различных областях медицины [Tsushima et al., 1995; Nishino et al., 2009; Hashimoto, 2009].

В связи с широким применением каротиноидов в практической медицине весьма актуальными становятся биотехнологические аспекты их получения. Большинство технологий базируется на культивировании одноклеточных планктонных микроводорослей (зеленых и диатомовых), которые являются источниками астаксантина, фукоксантина, перидинина и ряда других каротиноидов [Bhosale, Bernstein, 2005]. Получение культур с высоким содержанием соединений каротиноидного ряда является одной из приоритетных задач современной биотехнологии микроводорослей [Pulz, Gross, 2004]. Увеличение содержания превалирующего каротиноида в культуре определенного вида микроводорослей может достигаться двумя путями. С одной стороны ведутся работы по стимулированию каротиногенеза [Рудик, 1993; Mercadante, 1999]. С другой стороны проводятся работы по производству генетически модифицированных культур с целью увеличения содержания специфических каротиноидов [Del Campo et al., 2000; Bhosale Bernstein, 2005].

3.1.3. Содержание и качественный состав каротиноидов фитопланктонного сообщества Черного моря

Планктонные микроводоросли являются основным источником каротиноидов в морских и пресноводных экосистемах. Пигменты, синтезированные в их клетках, затем распределяются и подвергаются метаболической трансформации в трофических цепях.

Каротиноиды и видовое разнообразие фитопланктона. Исследования пигментного состава фитопланктона Мирового океана показали, что основной вклад в него вносят диатомовые и динофитовые микроводоросли [Konishi et al., 2006; Ston, Kosakowska, 2000], которые являются основным источником питания для многих гидробионтов, включая и моллюсков-фильтраторов [Hertzberg et al., 1988; Сеничева, 1990; Сеничева и др., 2006].

Многолетние наблюдения за составом фитопланктона показывают увеличение видового разнообразия планктонных микроводорослей практически во всех регионах Черного моря. Согласно последним сводкам, здесь регистрируется около 1000 видов и разновидностей микроводорослей [Алтухов, 2000; Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. Благодаря сгонно-нагонным процессам и близости

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

основного черноморского течения, прибрежные воды Крыма считаются типичными для всего Черного моря. В прибрежных водах Крымского полуострова можно встретить 386 видов и разновидностей водорослей из 8 отделов. Наибольший вклад вносят динофитовые водоросли – 154 вида; затем идут диатомовые – 140 видов и золотистые – 53 вида [Брянцева, 2008; Сеничева, 2008]. Вклад остальных видов не столь значителен: зеленые – 16; сине-зеленые – 12; криптофитовые – 7; эвгленовые – 2 и желто-зеленые водоросли – 1 вид. Наибольшее видовое разнообразие отмечено в районах Карадага (291 вид) и Севастопольского взморья (252 вида), наименьшее – в Севастопольской бухте (208) и районе Ласпи-Батилиман (202).

Большинство микроводорослей обладает видоспецифичными каротиноидами. Однако состав основных групп этих соединений остается неизменным в пределах класса [Liaaen-Jensen, 1989; Schagerl et al., 2003] (табл. 3.1). Это хорошо показано в исследованиях [Jeffrey et al., 1997; Брянцева, 2008; Сеничева, 2008]. Доминирование диатомовых в составе фитопланктона приводит к увеличению таких пигментов, как β,β -каротин, фукоксантин, диатоксантин, диноксантин, антраксантин, зеаксантин, диадиноксантин [Liaaen-Jensen, 1998].

Таблица 3.1

Основные отделы микроводорослей фитопланктона Чёрного моря и их состав каротиноидов [Jeffrey et al., 1997; Брянцева, 2008; Сеничева, 2008]

Отделы микроводорослей	Кол-во видов	Состав каротиноидов
1	2	3
Dinophyta (динофитовые водоросли)	154	Основные каротиноиды: фукоксантин; β,β -каротин, перидинин, диатоксантин, диадиноксантин, диноксантин. Видоспецифичные каротиноиды: фитоен, фитофлюен, астаксантин, пирроксантин, пирроксантинол, перидинол, P457, 19'-гексаноило-ксифукоксантин, 19'-бутаноилоксифукоксантин, 19'-гексаноилоксипарацентрон 3 ацетат, диэфир гироксантина, галоцинтиаксантин 3'-ацетат, 19'-бутаноил-оксигалоцинтиаксантин 3'-ацетат, 19'-гексаноилокси галоцинтиаксантин 3'-ацетат.
Bacillariophyta (диатомовые водоросли)	140	Основные каротиноиды: β,β -каротин, диатоксантин, диадиноксантин, фукоксантин. Видоспецифичные каротиноиды: ϵ,ϵ -каротин, неоксантин, эхененон, кантаксантин, фукоксантинол.
Chlorophyta (зеленые водоросли)	16	Основные каротиноиды: β,β -каротин, β,ϵ -каротин, лютеин, зеаксантин, антраксантин, виолоксантин, неоксантин. Видоспецифичные каротиноиды: β,ψ -каротин, ϵ,ϵ -каротин, β -криптоксантин, каритоксантин 5,6-эпоксид, лютеин эпоксид, лороксантин, β,β -каротин-2-ол, β,β -каротин-2,2'-диол, β,ϵ -каротин-2-ол, сифонаксантин, сифоноен, эхиненон, 3'-гидроксиэхиненон, 4'-гидроксиэхиненон, канта-ксантин, адонирубин, астаксантин.
Xanthophyta (желто-зеленые водоросли)	1	Основные каротиноиды: β,β -каротин, диадино-ксантин. Видоспецифичные каротиноиды: неоксантин, диэфир ваучериаксантина, диноксантин, диатоксантин, диэпоксид и моноэпоксид криптоксантина, гетероксантин.

Глава 3

1	2	3
Euglenophyta (эвгленовые водоросли)	2	<p>Основные каротиноиды: β,β-каротин, диатоксантин, диадиноксантин, гетероксантин, неоксантин.</p> <p>Видоспецифичные каротиноиды: β,ϵ-каротин, β-криптоксантин, криптоксантин-5',6'-эпоксид, лютеин эпоксид, эутрептиеланон, α-криптоэутрептиеланон, β-криптоэутрептиеланон, ангидродиатоксантин, 3,4,-7,8,3',4',7',8'-октадегидро-β,β-каротин, моноэфир 7,8,3',4',7',8'-гексадегидро-β,β-каротин-3-ол, диэфир аллоксантина, 19-моноэфир лороксантина, сифонеин.</p> <p>Вторичные каротиноиды: эхененон, 3-гидроксиэхененон, кантаксантин, астаксантин, пектенолон, эфиры адонирубина, адониксантин, 3S,3' S-астаксантин.</p>

Динофитовые водоросли характеризуются присутствием перидинина, перидинола, пирроксантина, пирроксантинола, эхененона [Repeta, Bjornland, 1997]. Золотистые водоросли большей частью представлены кокколитофоридами и помимо содержания β,β -каротина, β,ϵ -каротина, диатоксантина, фукоксантина, могут иметь 19-гексаноилсифукоксантин (у *E. huxleyi*), диадиноксантин и другие ксантофиллы [Jeffrey et al., 1997; Брянцева, 2008; Поспелова, 2008; Сеничева, 2008]. Каротиноидный состав зеленых микроводорослей очень близок к высшим растениям и содержит основные пигменты: β,β - и β,ϵ -каротин, лютеин, неоксантин, лороксантин и зеаксантин, а также виолоксантин и антероксантин. Встречаются виды, имеющие в своем составе астаксантин и кантаксантин [Jeffrey et al., 1997; Del Campo et al., 2000].

Цианобактерии, представленные 12 видами, являются показателями загрязнения бухт. Так, в Севастопольской бухте в 2006 году из-за сброса воды Чернореченского водохранилища их биомасса достигала до $3,6 \text{ г} \cdot \text{м}^{-3}$, а на взморье – $1-6 \text{ г} \cdot \text{м}^{-3}$. Токсичность этих водорослей, также как и криптофитовых связана с наличием фикобилипротеинов, что делает их непригодными для питания многих гидробионтов [Брянцева, 2008; Сеничева, 2008]. Помимо специфических фикобилипротеинов в составе пигментов они имеют такие как β,β -каротин, зеаксантин, миксоксантофилл, эхененон, кантаксантин, а некоторые виды цианобактерий синтезируют осцилаксантин, миксол-2'- и 4-кетодиоксимиксол-2'-фукоксид и другие видоспецифичные каротиноиды [Hans, 1981; Mochimaru et al., 2008].

Структура вышеперечисленных каротиноидов и их связь с некоторыми классами микроводорослей были проанализированы на основе учета разнообразия строения концевых групп молекул [Britton et al., 1998]. Наиболее разнообразными являются каротиноиды у микроводорослей класса Prasinophyceae (18 различных концевых групп), следующими являются классы Dinophyceae (14 видов концевых групп), Chlorophyceae (13 видов концевых групп), Euglenophyceae (13 видов концевых групп), Prymnesiophyceae (12 видов концевых групп). Остальные систематические группы микроводорослей ограничены 6-8 видами таких групп. У зеленых микроводорослей и динофлагеллят в составе каротиноидов присутствует наиболее полный спектр концевых групп: β -, γ -, ϵ -, ψ -группы, алленовые, ацетиленовые, 7,8-дидегидро-, эпокси-, кето-, 3-ацетат-группы, эфирные и другие.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Таким образом, черноморский фитопланктон характеризуется значительным видовым разнообразием, что накладывает отпечаток на качественный состав и особенности внутримолекулярной структуры каротиноидов фитопланктонного сообщества.

Сезонные изменения состава каротиноидов в фитопланктонном сообществе. Многолетние циклы сезонных изменений состава фитопланктона в акваториях Севастополя приведены в ряде работ [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008; Куфтаркова, Сеничева, 2009; Стельмах и др., 2009]. Показано, что фитопланктон в своем развитии проходит через ряд направленных во времени изменений – сукцессий. Классическая схема, свойственная черноморскому фитопланктону 1970-х годов: развитие мелкоклеточных диатомовых водорослей (первая стадия), на смену которым приходят крупноклеточные диатомовые (вторая стадия), а заканчивается доминированием динофитовых водорослей (третья стадия) [Виноградова и др., 1986].

Изменения в видовом разнообразии черноморского фитопланктона, отмеченные в последние десятилетия, отразились на характере развития этих стадий [Нестерова, 2003; Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. По аналогии с прошлыми годами в фитопланктонном сообществе проходило три сукцессии: весенне-летняя, осенняя и зимняя. Первую стадию весенне-летней сукцессии формировали мелкоклеточные диатомовые из рода *Chaetoceros*, которые в осенне-зимне-весенний период достигали массового развития. На Севастопольском взморье в 2000-2006 годы они были представлены наибольшим числом видов (112), многие из которых обнаружены впервые [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. С февраля по май в прибрежных водах Крыма видовое разнообразие диатомей составило около 50-ти видов. С мая по сентябрь обычно происходит снижение их численности и биомассы. Начиная с апреля, в прибрежных водах Севастополя существенно возрастало видовое разнообразие динофитовых. Их биомасса летом за период с 2000 по 2006 годы иногда достигала $1,3 - 1,9 \text{ г} \cdot \text{м}^{-3}$. Снижение их численности наступало только поздней осенью.

В последние годы в Севастопольской бухте и на взморье отмечено сильное влияние сточных пресных вод, что привело к зимнему «цветению» и увеличению числа видов характерных для распресненных вод [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. Вследствие этого в 2006 году с марта и до конца года происходило доминирование зеленых и сине-зеленых водорослей и снижение содержания диатомовых, золотистых и динофитовых [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008; Стельмах и др., 2009].

Изучение годичных циклов изменения видового разнообразия фитопланктона Севастопольских бухт дает возможность проследить и динамику качественного состава основных каротиноидов. В более холодные периоды, когда в составе фитопланктона превалировали диатомовые водоросли, доминирующими каротиноидами должны быть фукоксантин, диатоксантин, диадиноксантин, помимо β, β -каротина, присущего большинству классов микроводорослей. В более теплый период времени, когда преобладают динофитовые, в воде должно повышаться относительное содержание перидинина. В сильно эвтрофированных районах, где доминируют зеленые и сине-зеленые микроводоросли, следует ожидать рост содержания лютеина, виолоксантина, зеаксантина, эхененона, кантаксантина и ряда других пигментов.

Каротиноиды доминирующих видов фитопланктона Черноморского региона как объекта питания моллюсков. Ценность микроводорослей как кормовых объектов для моллюсков-фильтраторов изучалась многими авторами [Цихон-Луканина, 1976; Сеничева, 1990; Ладыгина, 2005; Rico-Villa et al., 2006]. К ним относятся такие виды, как *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri* (золотистые водоросли), *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella viridis* (зеленые микроводоросли), *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornerutum* (диатомовые водоросли) [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. Они в большей или меньшей степени присутствуют в составе морского фитопланктона. С учетом сезонной динамики определенный вид микроводоросли может доминировать в морской среде, давая преимущество в накоплении тех или иных каротиноидов в тканях моллюсков-фильтраторов.

Состав каротиноидов доминирующих видов фитопланктона хорошо изучен [Britton et al., 1998; Поспелова, Нехорошев, 2003; Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. При этом следует учитывать не только качество питательного субстрата, но и избирательность питания, которая имеет как видовую, так и возрастную специфику. Так, особи мидий могут отфильтровывать клетки водорослей объемом 4-100000 мкм³, но усваивают только часть ультра- и нанопланктонных организмов. К ним относят перидиниевые, золотистые, мелкие жгутиковые, доминирующие в поздневесенний, летний и позднеосенний периоды [Сеничева, 1990].

При сравнении водорослевой и детритной взвеси в качестве корма обнаружено, что мелкие черноморские мидии втрое интенсивнее отфильтровывают водоросли, мидии средних размеров одинаково фильтруют оба типа пищи, а самые крупные моллюски с большей скоростью потребляют детрит [Заика и др., 1990]. При микроскопическом исследовании содержимого пищеварительного тракта митилид чаще всего наблюдаются частицы детрита (91 % встречаемости), затем следуют диатомовые (70 %), динофлагелляты (60 %) и животные (40 %) [50].

Классы микроводорослей отличаются спецификой тканевого содержания и качественного состава С₄₀-каротиноидов [Liaaen-Jensen, 1989; 1990], что определяет особенности ассимиляции и метаболической трансформации этой группы соединений у моллюсков-фильтраторов [Partali et al., 1985, 1989; Britton et al., 1998; Liaaen-Jensen, 1998, 1990]. В микроводорослях и двустворчатых моллюсках можно встретить одни и те же каротиноиды: группа β-каротинов (β,ε-каротин; β,β-каротин; β,ψ-каротин; ε,ε-каротин), диатоксантин, диадиноксантин, экшенон, фукоксантин, 19'-гексаноилоксифукоксантин, лютеин, неоксантин, перидинин, зеаксантин и многие другие [Jeffrey et al., 1997]. При этом многие каротиноиды тканей моллюсков появляются в результате метаболической трансформации водорослевых пигментов. Эти процессы имеют особое значение для понимания функциональной значимости отдельных соединений каротиноидного ряда для клеток, тканей и организма гетеротрофов.

Исходя из анализа состава каротиноидов тканей большинства изученных двустворчатых моллюсков, можно предположить, что их основными источниками являются диатомовые водоросли, коккофилиды и большинство динофитовых.

Согласно данным сотрудников ИнБЮМ НАН Украины, за период проведения настоящих исследований 2007-2008 годы доминирующими видами фитопланктонного сообщества являлись диатомовые водоросли (49-93 % биомассы) [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008; Куфтаркова, Сеничева, 2009; Стельмах

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

и др., 2009] (табл. 3.2). На долю динофитовых приходилось от 2,3 до 5,9 % от суммарной биомассы фитопланктона. Практически такой же вклад вносили и кремнежгутиковые (2,3-6,9 %), в основном *E. huxleyi*. С февраля 2007 по май повсеместно преобладали диатомовые водоросли *Chaetoceros curvisetus*, *C. socialis*, *Pseudonitzschia seriata*, *Skeletonema costatum*, создавая от 51 до 93 % биомассы нано- и микрофитопланктона. И только в июне 2007 на смену диатомовым пришли динофитовые. Среди них были *Prorocentrum micans*, *P. cordatum*, *Gymnodinium sp.* Их доля в суммарной биомассе составила 66-67 % [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. Результаты настоящих исследований позволяют говорить о составе каротиноидов, которые получали с пищей моллюски-фильтраторы за период проведения настоящей работы.

Таблица 3.2

Доминирующие виды фитопланктона на взморье Севастополя за период проведения настоящих исследований [Куфтаркова, Сеничева, 2009; Стельмах и др., 2009]

Год	Месяцы					
	I	II	III	IV	V	VI
2007	сине-зеленые водоросли	<i>S. costatum</i> , <i>E. huxleyi</i>	<i>S. costatum</i>	<i>S. costatum</i> , <i>C. socialis</i>	<i>E. huxleyi</i> , <i>S. costatum</i> , <i>C. socialis</i>	
	VII	VIII	IX	X	XI	XII
			<i>E. huxleyi</i> , <i>S. costatum</i> , <i>Cerataulina pelagica</i>			<i>S. costatum</i>
2008	I	II	III	IV	V	VI
	<i>S. costatum</i>	<i>S. costatum</i>	<i>S. costatum</i>	<i>C. curvisetus</i> , <i>C. socialis</i> , <i>Chaetoceros tortissimus</i> ,	<i>Pseudosolenia calcaravis</i>	<i>E. huxleyi</i>

3.1.4. Содержание и качественный состав каротиноидов тканей черноморских моллюсков-фильтраторов

Двустворчатые моллюски относятся к уникальной группе организмов-фильтраторов. Перемещая значительные количества воды через мантийную полость, они способны аккумулировать в тканях разнообразные ксенобиотики в концентрациях, значительно превышающих предельно допустимые величины [Sheehan et al., 1995; Bebbiano et al., 1997; Chandra et al., 1998]. Устойчивость к токсическим нагрузкам определяется присутствием в их тканях высокоэффективного антиоксидантного (АО) ферментативного комплекса [Cossu et al., 1997, 2000; Niyogi et al., 2001; Солдатов и др., 2008], который существенно

Глава 3

дополняет молекулярные системы неспецифической антирадикальной защиты. Основной составляющей последней являются пигменты каротиноидного ряда [Осипов и др., 1990; Кения и др., 1993; Меньшикова и др., 1993; Солдатов и др., 2008].

Моллюски аккумулируют каротиноиды в процессе питания (в основном из микроводорослей), и способны подвергать их специфической метаболической трансформации [Britton et al., 1998, 2008; John, Landrum, 2010]. В их клетках обнаружен особый органоид – каротиноидосомы [Бриттон, 1986]. Имеющаяся информация позволяет констатировать, что ткани моллюсков располагают достаточно широким спектром процессов, направленных на преобразование каротиноидов, получаемых с пищей: окисление, восстановление, преобразование двойных связей, окислительное расщепление двойных и эпоксидных связей и т.д. [Britton et al., 1998]. В этой связи трофическая цепь «фитопланктон → моллюски-фильтраторы → хищники» представляет особый интерес, так как именно здесь происходит радикальное преобразование данной группы пигментов. Изучение аспектов тканевого метаболизма каротиноидов в указанной трофической цепи и определило одну из задач настоящего исследования.

Особенности спектров питания черноморских двустворчатых моллюсков-фильтраторов. Пищей двустворчатых моллюсков, в основном, служит взвешенный в воде детрит, фито- и зоопланктон, донный детрит и донные микроводоросли. По типу потребляемого пищевого субстрата морские донные беспозвоночные подразделяются на следующие группы: сестонофаги, фитофаги, детритофаги и плотоядные [Цихон-Луканина, 1976, 1987]. Большинство черноморских двустворчатых моллюсков представлено сестонофагами-фильтраторами и детритофагами-фильтраторами [Цихон-Луканина, 1987]. Сестонофагам пищей служит сестон, главным образом фитопланктон и взвешенный детрит, детритофагам – донный детрит и микроводоросли. Среди сестонофагов выделяют фильтраторов, прогоняющих воду через отцеживающий аппарат, и седиментаторов, осаждающих взвесь. Среди детритофагов по способу питания выделяют виды, собирающие детрит с поверхности грунта, и виды, заглатывающие грунт целиком вместе с детритом с глубины в несколько сантиметров.

Пищевой спектр моллюсков-сестонофагов состоит главным образом из фитопланктонных водорослей – диатомовых, синезеленых, динофлагеллят и взвешенного детрита, а также бактерий, попадающих в пищеварительный тракт вместе с детритом. В пищеварительный тракт сестонофагов попадают в небольшом количестве и мелкие зоопланктонные организмы – простейшие, яйца и личинки донных и планктонных беспозвоночных, а также минеральные частицы. Соотношение различных компонентов пищевого спектра зависит от сезона, степени развития фитопланктона и от мутности прибрежных вод. Пищевой спектр черноморских моллюсков-детритофагов в основном состоит из донного поверхностного детрита и микрофитов, главным образом донных диатомовых водорослей и примеси минеральных частиц [Заика и др., 1990].

Спектр питания черноморской мидии обычно близок к составу планктона, где они обитают [Заика и др., 1990; Холодов и др., 2010]. У особей из естественных поселений доля детрита может составлять до 80 % от потребляемого пищевого субстрата, тогда как в период «цветения» в пищеварительном тракте моллюсков

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

будут доминировать водоросли. В питании коллекторных мидий преобладают перидиниевые и кокколитофоридовые водоросли, в меньшей степени диатомовые и зеленые микроводоросли [Зайка и др., 1990; Холодов и др., 2010]. По данным М.М. Даниловой, для черноморской мидии характерен достаточно широкий спектр питания: в весенний период преобладает фитопланктон (в основном диатомовые и перидиниевые), а зоопланктон выполняет второстепенную роль. В летний период, наоборот, ведущую роль выполняют тинтинны, копеподы, мшанки, коловратки, личинки турбеллярий, яйца изопод, ночесветки и др. [Данилова, 2002].

Устрицы, также как и мидии, являются фильтраторами, питающимися бактериями, микроводорослями, детритом и т.д. [Холодов и др., 2010]. Однако эффективность фильтрации у них существенно ниже. Более 50 % бактериопланктона не задерживается в их фильтрующем аппарате. Предельный размер фильтруемых частиц оказывается не менее 4 мкм [Цихон-Луканина, 1987]. Основной источник пищи устриц – диатомеи, на втором месте – простейшие, включая голых жгутиконосцев. Отличительной особенностью является подчиненное значение детрита в спектре питания большинства устриц [Цихон-Луканина, 1987; Холодов и др., 2010].

Виды рода *Modiolus* питаются в основном детритом, но в спектр питания также входят диатомеи, голые жгутиконосцы, перидинии, тинтинниды, кокколитофориды, яйца и личинки двустворок [Цихон-Луканина, 1987].

Особенности спектра питания гребешков (*Pectinida*) также достаточно широко освещены в отечественной литературе [Цихон-Луканина, 1987]. В пищеварительном тракте *Patinopectene yessoensis* идентифицирован 161 вид организмов, среди которых найдены споры, яйца, детрит и минеральные частицы. В пищевом субстрате явно преобладали диатомеи, затем простейшие, перидинии, членистоногие, личинки моллюсков, хризофитовые микроводоросли, коловратки [Цихон-Луканина, 1987]. В целом, для питания отряда *Pectinida* характерно доминирование детрита (67 %).

Для питания сердцевидок (*Venerida*) также характерно преобладание детрита и одноклеточных водорослей, которые во время «цветения» могут занимать значительную часть пищевого комка. Кардииды добывают пищу как из взвеси, так и из грунта, который они взмучивают при движении. Размер пищевых частиц обычно не превышает 40 мкм [Цихон-Луканина, 1987].

Более полный анализ спектра питания морских и пресноводных моллюсков представлен в работах Е.А. Цихон-Луканиной [Цихон-Луканина, 1976, 1987].

Содержание и состав каротиноидов в тканях массовых видов моллюсков-фильтраторов. Содержание и качественный состав каротиноидов тканей двустворчатых моллюсков наиболее полно изучен у видов, являющихся объектами промысла и марикультуры, так как эти характеристики в значительной степени определяют их пищевую ценность. К ним относятся: устрицы, мидии, морские гребешки, венерупсисы, мактры, песчаная ракушка, сердцевидка, анадара, корбикулы, беззубки и некоторые другие виды. В Черном море сохраняется промысел и культивирование мидий (*Mytilus galloprovincialis*), налаживается культивирование устриц *Crassostrea gigas* [Холодов и др., 2010]. Биологическая ценность этих моллюсков хорошо известна [Холодов и др., 2010]. К перспективным объектам марикультуры на Черном море можно отнести *Anadara inaequalvis* (Br.), *Mya arenaria* (Lim.) и *Cardium edule* [Холодов и др., 2010].

Глава 3

Наиболее полно в работах отечественных и зарубежных исследователей представлен качественный состав каротиноидов представителей рода *Mytilus*, которые широко распространены в Мировом океане [Czeczuga, 1976; Goodwin, 1984; Hertzberg et al., 1988; Partali et al., 1989]. Ведутся активные работы по изучению состава пигментов тканей моллюсков дальневосточного региона и Тихого океана: *Crassostrea gigas* [Goodwin, 1984; Fujiwara et al., 1992; Maoka et al., 2005; Rico-Villa et al., 2006], *Scapharca sp.* [Matsuno et al., 1981; Goodwin, 1984], *Patinopectene yessoensis* [Goodwin, 1984; Kantha, 1989; Bjerkgeng et al., 1993]. Встречаются работы по изучению состава каротиноидов *Mya arenaria* и *Modiolus modiolus* [Bjerkgeng et al., 1993; Esteveza et al., 2002].

Как уже отмечалось, каротиноиды морского генезиса имеют ряд принципиальных особенностей, одной из которых является значительная видоспецифичность их состава и строения [Liaaen-Jensen, 1990; 1991; Britton et al., 1998]. Так, у гребешков и мидий они представлены преимущественно соединениями ацетиленовой группы, такими как митилоксантин, аллоксантин, пектенолон, пектенол *A* и *B*, астаксантин, перидинин [Hertzberg et al., 1988; Bjerkgeng et al., 1993]. У морского гребешка *Pecten maximus* были также обнаружены 4-(4'')-кето-С₄₀-каротиноиды [Bjerkgeng et al., 1993].

Состав каротиноидов устриц очень разнообразен и представлен 22 пигментами, среди которых есть присущие только данной систематической группе соединения – это крассоостреаксантин *A* и *B* [Fujiwara et al., 1992; Maoka et al., 2001, 2005].

Каротиноиды *M. modiolus* также как у мидий представлены соединениями ацетиленового ряда: эхененоном, пирроксантином, (3R,3'R)-зеаксантином, диатоксантином, (3S,3'S)-астаксантином, пектенолоном, митилоксантином, 9,9'-дицис-аллоксантином, перидинином и др., всего – 16 каротиноидов. Общая схема метаболизма каротиноидов в тканях у *M. modiolus* сходна с мидиями (*M. edulis*). Кроме этого этот вид обладает способностью к окислению диатоксантина в пектенолон и 3R,3'R-зеаксантина в 3S,3'S-астаксантин [Bjerkgeng et al., 1993; Esteveza et al., 2002].

Значительный объем исследований выполнен по изучению качественного состава каротиноидов тканей представителей рода *Anadara* [Matsuno et al., 1981; Goodwin, 1984; На et al., 1989]. Дальневосточные популяции видов, относящихся к данному роду, отличались присутствием в тканях пектенолона аллоксантина, диатоксантина, а также их моно- и диэфиров, причем на эфиры приходилось до 65 % состава, что отражает видовую специфику метаболизма соединений каротиноидного ряда.

Пути метаболической трансформации каротиноидов в трофической цепи «фитопланктон → моллюски-фильтраторы». Спектр питания моллюсков-фильтраторов включает микроводоросли и зоопланктон. Это означает, что ассимиляция каротиноидов в процессе питания моллюсков может происходить двумя путями:

- фитопланктон → моллюски-фильтраторы;
- фитопланктон → зоопланктон → моллюски-фильтраторы.

Трансформация каротиноидов на этапе фитопланктон → зоопланктон практически не исследована. Известен факт, что из (3R, 3'R)-зеаксантина у дафнии *D. magna* образуется (3S, 3'S)- астаксантин, а β,β-каротин приводит к образованию

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

кантаксантина через эхененон. Необходимо отметить, что β,β -каротин и (3R, 3'R)-зеаксантин имеет водорослевое происхождение (рис. 3.1) [Portali et al., 1985; Britton et al., 1998].

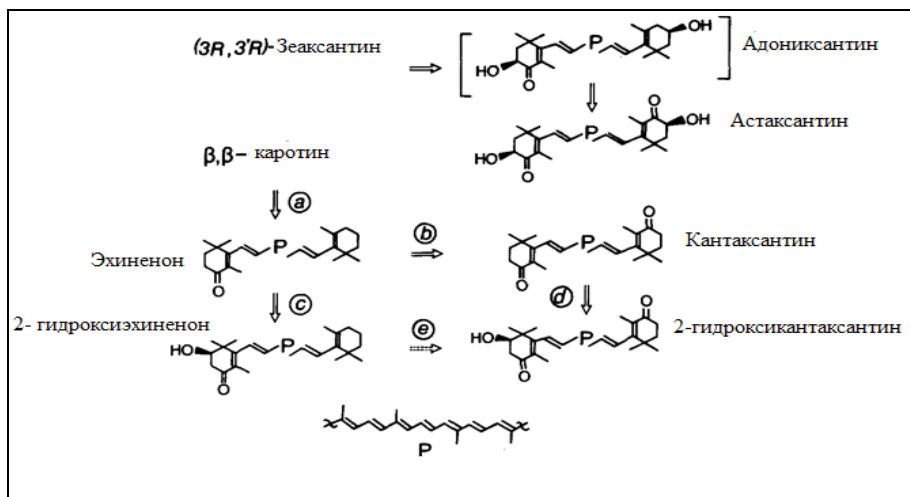


Рис. 3.1. Метаболическая схема трансформации каротиноидов в теле *D. magna*

Одна из первых моделей метаболической трансформации каротиноидов фитопланктон \rightarrow моллюски-фильтраторы была изучена на примере *Mytilus edulis* (рис. 3.2) [Portali et al., 1989].

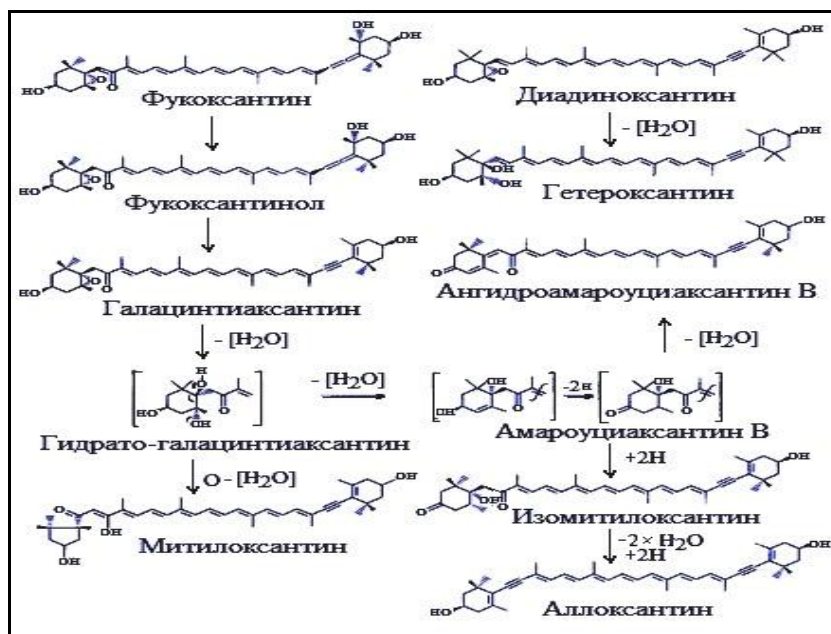


Рис. 3.2. Метаболическая схема трансформации C_{40} -каротиноидов в тканях *Mytilus edulis* [Portali et al., 1989]

При достаточном содержании в фитопланктоне представителей Prymnesiophyceae, Chrysophyceae или Dinophyta мидиям становятся доступны

каротиноиды-ксантофиллы, такие как фукоксантин, 19'-галоцантиаксантин, диадиноксантин и перидинин. При таком микроводорослевом рационе в тканях *Mytilus edulis* накапливаются каротиноиды с ацетиленовой связью и 3-гидрокси-7,8-дидегидро- β -группой на конце молекулы [Portali et al., 1989; Britton et al., 1998]. На сегодняшний день известны 3 типа метаболических путей преобразования каротиноидов в тканях мидий при потреблении микроводорослей [Britton et al., 1998]:

- реакция гидролиза ацетата, например, фукоксантина в фукоксантинол, перидинина в перидинол;
- преобразование алленовой связи в ацетиленовую связь на концах молекулы, например, фукоксантинол \rightarrow галоцантиаксантин, 19'-гексаноилоксифукоксантин \rightarrow 19'-гексаноилоксиизомитилоксантин, перидинол \rightarrow пирроксантинол;
- конверсия 5,6-эпокси- в 5,6-гликоль-группы: диадиноксантин \rightarrow гетероксантин, пирроксантинол \rightarrow гидрато-пирроксантинол.

Из схемы (рис. 3.2) видно, что аллоксантин является конечным продуктом метаболизма изомитилоксантина, а фукоксантин образует галоцантиаксантин, из которого образуется митилоксантин [Britton et al., 1998]. При этом фукоксантин является предшественником изомитилоксантина. Последний поддерживает конверсию 19'-гексаноилоксифукоксантина в 19'-гексаноилоксиизомитилоксантин (рис. 3.3) [Britton et al., 1998]. Окончательная же схема метаболической трансформации 19'-гексаноилоксикаротиноидов не установлена. Она предполагает существование других соединений, относящихся к данной группе.

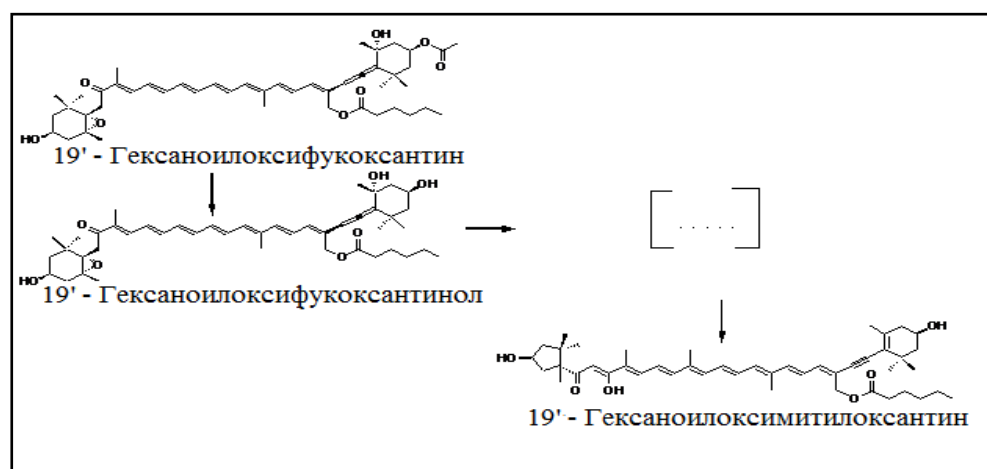


Рис. 3.3. Схема трансформации 19'-гексаноилоксикаротиноидов в тканях *Mytilus edulis* [Hertzberg et al., 1988; Britton et al., 1998]

К каротиноидам, характерным для морских моллюсков, образующимся путем метаболических преобразований водорослевых пигментов, можно отнести митилоксантин и изомитилоксантин, обнаруженные у *Mytilus edulis*; диатоксантин, аллоксантин и пектенолон – у *Pecten maximus* и *Patinopectene yessoensis*; пектенол A и B, 8'-апоаллоксантинал – у *Mytilus coruscus*; мактраксантин – у *Macra chinensis* [Maoka et al., 2007]; красостреаксантин A и B, и 3,4-дигидрокси- β -концевая

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

группа молекул каротиноидов – у *Crassostrea gigas* [Fujiwara et al., 1992; Maoka et al., 2001, 2005].

Такой каротиноид как аллоксантин, накапливается у многих двустворчатых моллюсков при отсутствии его в спектре питания (в микроводорослях). Это привело к появлению гипотезы о формировании его через фукоксантин, галоцантиаксантин [Partali et al., 1989], хотя прямых доказательств на сегодняшний день нет [Britton et al., 1998]. После открытия японскими учеными крассоостреаксантина *A* и *B* в тканях устриц, ими была предложена схема метаболизма каротиноидов этого моллюска: из фукоксантина до крассоостреаксантина *A* и *B* [Маока, 2011]. Таким образом, на примере двустворчатых моллюсков была изучена одна из основных схем метаболизма каротиноидов от фукоксантина до митилоксантина, аллоксантина [Britton et al., 1998]. Эти процессы могут являться также основой для реализации дополнительных схем, приводящих, например, к образованию крассоостреаксантина *A* и *B* у устриц [Маока, 2011].

3.1.5. Содержание и качественный состав каротиноидов тканей хищных видов моллюсков

Первые исследования по изучению качественного состава каротиноидов у различных видов моллюсков-хищников были выполнены в середине 50-х годов прошлого столетия [Fisher et al., 1956]. Авторы оценили суммарный уровень каротиноидов и показали присутствие в тканях витамина А и β-каротина.

Позже качественный состав соединений каротиноидного ряда был изучен более подробно [Katagiri et al., 1986; Maoka et al., 1988, 1989, 2010; Britton et al., 1998, 2008]. Особое внимание было сосредоточено на классе гастропод. Так, в тканях *Patella depressa* и *P. vulgata* были обнаружены β-каротин, эхененон, β-криптоксантин и зеаксантин [Fisher et al., 1956; Shahidi et al., 1998]. У *Hopkinsia rosacea* и *Triopha carpenteri* были выявлены видоспецифичные хопкинсиксантин и триофаксантин [Goodwin, 1984; Shahidi et al., 1998]. Показано, что для хищных видов моллюсков Тихого океана характерны каротиноиды, содержащие 3S-конфигурацию, а также 7,8-дидегидро-, 4,4-дигидрокси- и 4-кето-группы в составе своих молекул [Katagiri et al., 1986; Maoka et al., 1989; Britton et al., 1998; 2008].

Подробные исследования были выполнены на представителях рода *Fusinus*: *F. perplexus*, *F. ferrugineus*, *F. forceps* [Katagiri et al., 1986; Matsuno et al., 1989; Tsushima et al., 1995; Matsuno, 2001]. В их тканях был обнаружен достаточно широкий спектр каротиноидов: кантаксантин, β-каротин, изокриптоксантин, эхененон, лютеин, зеаксантин, диатоксантин, аллоксантин, митилоксантин (следы), (3S, 3'S)-астаксантин, галоцантиаксантин, а также выделены присущие только этим видам (3S)-фоеникоксантин (адонирубин), 4,4'-дигидрокси-пирардиксантин, 4,4'-дигидрокси-5,6,5',6'-тетрагидро-β,β-каротин, фритшелоксантин (рис. 3.4) [Katagiri et al., 1986; Matsuno et al., 1989; Tsushima et al., 1995; Matsuno, 2001].

Особенностью каротиноидов рода *Fusinus* является наличие 5,6-дигидро-β-групп на концах молекул, что хорошо видно из схемы метаболизма каротиноидов в морских улитках (рис. 3.4) [Matsuno et al., 1984; Britton et al., 1998]. Изучена также тканевая специфика распределения каротиноидов у этих видов гастропод: в мышечной ткани преимущественно накапливаются кантаксантин, фоеникоксантин,

фритшелоксантин, 4,4'-дигидроксипирардиксантин; в гонадах – β -каротин, изокриптоксантин и эхененон; в гепатопанкреасе – β -каротин и галоцинтиаксантин [Shahidi et al., 1998].

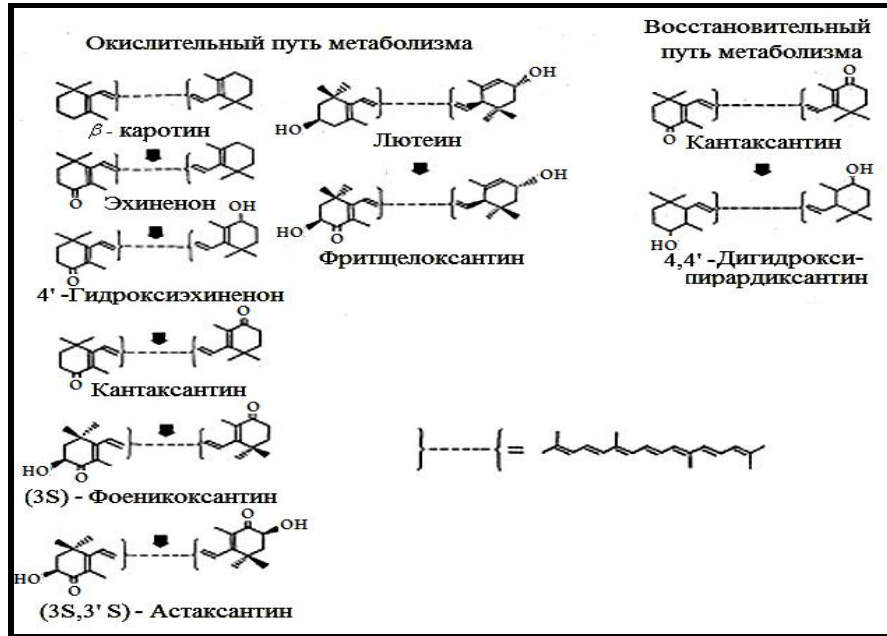


Рис. 3.4. Схема метаболизма каротиноидов в тканях тихоокеанских гастропод *Fusinus* sp. [Matsuno et al., 1989]

В периодических изданиях имеется также ограниченная информация о содержании и составе каротиноидов у других хищных видов гастропод и цефалопод [Shahidi et al., 1998; Matsuno, 2001].

Особый интерес представляют виды Echinodermata, питающиеся как двустворчатыми моллюсками, так и хищными видами брюхоногих моллюсков, например *Rapana venosa*. К ним относятся *Asterina pectinifera*, *Asterias amurensis*, *Acanthaster planci*, *Asterias rubens* [Britton et al., 1998, Matsuno, 2001; Maoka, 2011]. Состав каротиноидов представителей родов *Asterina* и *Acanthaster* изучался на протяжении ряда лет [Bernhard et al., 1982; Britton et al., 1998, Maoka et al., 2010]. Одним из первых был обнаружен 7,8-дидегидро-астаксантин [Maoka et al., 2010]. Чуть позже у *Asterias rubens* было выявлено 5 каротиноидов [Bernhard et al., 1982]. В настоящее время количество их приближается к 20-ти (*Acanthaster planci*) [Maoka et al., 2010; 2011]. Перечень включает β -каротин, эхененон, кантаксантин, 7,8,7',8'-тетрагидроастаксантин, 7,8-дидегидроастаксантин, астаксантин, пектенолон, аллоксантин, диатоксантин, диадиноксантин, 7,8-дидегидро-диадиноксантин, 3'-эпигобиусксантин, пектенол А, пектенол В, 4-кето-4'-гидроксиатоксантин, 4-кето-деэпокси-неоксантин, деэпокси-неоксантин, гетероксантин, перидиниол, 4-оксомитилоксантин. Основными считаются астаксантин, фоееникоксантин (адонирубин) и кантаксантин [Maoka et al., 2010]. Остальные представлены в минорном количестве. Для представителей родов *Asterina* и *Acanthaster* характерны каротиноиды с 4-кето-группами, высокое содержание 7,8-дидегидроастаксантина,

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

фритцелоксантина, аллоксантина, пектенолона и диатоксантина [Britton et al., 1998]. Отличительной особенностью каротиноидов тканей морских звезд является присутствие особого каротинопротеина – астериорубина.

Перечень хищных видов брюхоногих моллюсков в Черном море не столь велик. К ним, прежде всего, принадлежит *Rapana venosa*, попавшая в Черное море еще в первой половине прошлого столетия [Чухчин, 1984; Гаевская, 2006]. Из-за отсутствия естественного хищника – морской звезды – она быстро размножилась, что привело к массовому уничтожению естественных популяций устриц (*Ostrea edulis*), гребешков (*Flexopecten ponticus*) и сокращению численности мидий (*Mytilus galloprovincialis*). К хищным видам черноморских гастропод принадлежит и *Trophonopsis breviata*, питающаяся в основном модиолами (*Modiolus phaseolinus*) [Чухчин, 1984; Гаевская, 2006]. Достаточно распространена и *Tritia reticulata*, которая по типу питания относится к падальщикам [Цуканов, 1980]. Следует отметить, что качественный и количественный состав каротиноидов этих видов брюхоногих практически не исследован. Имеются лишь данные об общем содержании этой группы соединений в тканях животных.

3.1.6. Пути трансформации каротиноидов в трофической цепи «моллюск-фильтратор → хищник (морская звезда)»

Выбор данной трофической цепи в настоящем подразделе обусловлен тем, что это единственный хорошо изученный путь метаболической трансформации каротиноидов в системе «моллюск-фильтратор → хищник». Остальная информация крайне фрагментарна. Эта пищевая цепь рассмотрена в работах многих авторов [Matsuno et al., 1984; 1989; Maoka et al., 2011]. Показано, что в пигментном составе мидий и морских звезд присутствует несколько общих каротиноидов: β-каротин, митилоксантин, аллоксантин, даидиноксантин, диатоксантин, пектенол А и В, которые они могут ассимилировать в процессе питания [Liaaen-Jensen, 1990; 1991; Britton et al., 1998]. Остальные пигменты появляются в теле звезд либо через другие пищевые субстраты, либо на основе метаболической трансформации исходных. Более подробно процессы метаболической трансформации каротиноидов в теле хищника (*Acanthaster planci*) рассмотрены в работах [Britton et al., 1998; Maoka et al., 2010; 2011] (рис. 3.5).

Как отмечалось, одним из основных пигментов морской звезды является каротинопротеин – астериорубин, в состав которого входят 7,8,7',8'-тетрадегидроастаксантин (50-79 % от общей суммы), 7,8-дидегидроастаксантин (22-40 %) и астаксантин (5-10%). Это означает то, что он является комплексным соединением. Все пигменты, составляющие астериорубин имеют 4-оксо-, α-кето-группы в 3 S положении. Каротиноиды астериорубина – это каротиноиды с тройными ацетиленовыми связями в 7,8 (7', 8') положениях. Присутствие этой группы соединений в тканях *Asterias rubens* является феноменальным и поднимает вопрос о путях их синтеза, в основе которых могут лежать процессы независимой (7,8) – дегидрогенации [Bernhard et al., 1982; Britton et al., 1998; Maoka et al., 2010; 2011].

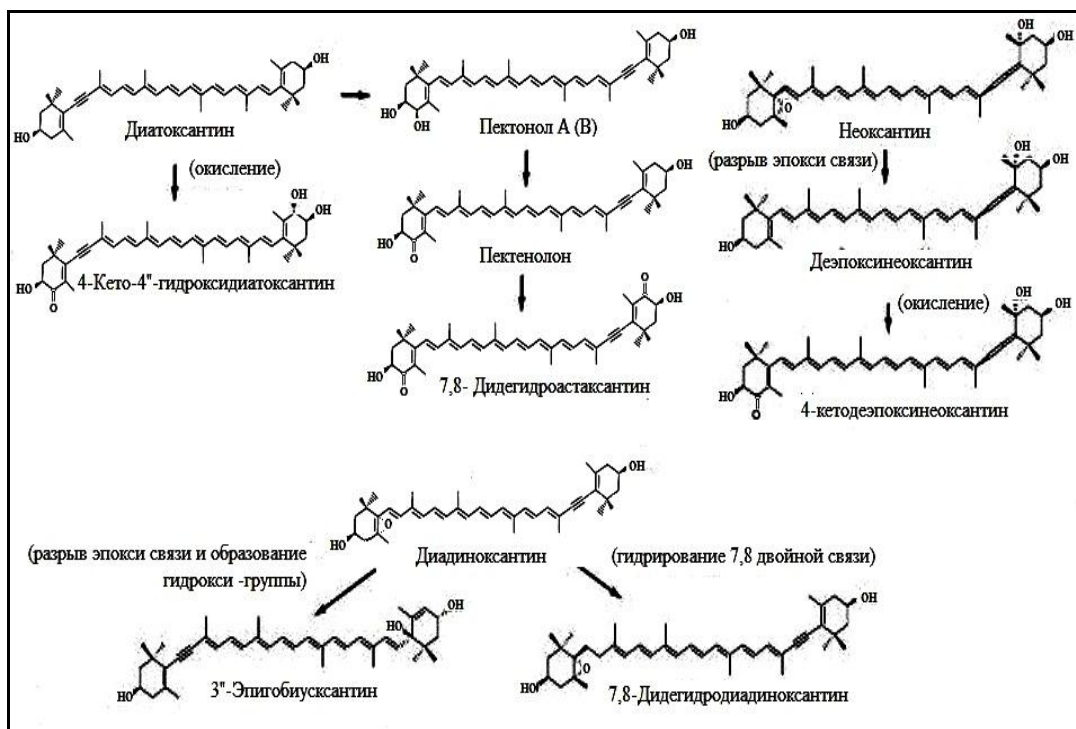


Рис. 3.5. Основные пути метаболической трансформации каротиноидов в теле *Acanthaster planci* [Britton et al., 1998; Maoka et al., 2010; 2011]

Считается, что накопление в каротинопротеине (астериорубине) астаксантина связано с присутствием в рационе морской звезды высокого содержания аллоксантина [Britton et al., 1998]. Диатоксантин и (3R, 3'R)-аллоксантин накапливаются у морских звезд исключительно из пищевых субстратов, затем происходит трансформация этих каротиноидов до ацетиленовых производных астаксантина [Britton et al., 1998]. Трансформация аллоксантина в 7,8,7',8'-тетрадегидро-астаксантин является метаболической реакцией, приводящей к образованию 4,4'-кетогрупп, а 4-гидрокси-соединения возникают как промежуточные варианты. Поэтому в составе каротиноидов морских звезд присутствуют: (3S, 4S, 3'S, 5'R)-4-гидрокси-митилоксантин, (3S, 4S, 3'S, 4'S)-4,4'-дигидрокси-диатоксантин, (3S, 3'S, 4'S)-4-кето-4'-гидрокси-диатоксантин, (3S, 4S, 3'S, 4'S)-4,4'-дигидрокси-аллоксантин, (3S, 3'S, 4'S)-4-кето-4'-гидрокси-аллоксантин [Matsuno, 2001].

Содержание кантаксантина и 4-оксомитилоксантина в теле звезд было незначительным. Присутствие же 4-оксомитилоксантина указывает на его источник – митилоксантин, который присутствует в тканях *Mytilus edulis* [Bernhard et al., 1982]. Несмотря на обилие информации, метаболическая трансформация ацетиленовых каротиноидов в тканях мидий и морских звезд не считается до конца изученной, прежде всего, ввиду их неполной идентификации [Bernhard et al., 1982; Maoka et al., 2010; 2011].

Анализ материала, представленного в настоящем разделе, позволяет сделать ряд обобщений.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

- Содержание и спектр каротиноидов тканей представителей Mollusca, Echinodermata и ряда других систематических групп организмов изучаются уже на протяжении более 50-ти лет. Это позволило сравнительно полно исследовать состав каротиноидов у представителей родов *Mytilus*, *Fusinus*, *Asterina*, *Acanthaster* и других, а также перейти к изучению процессов их метаболической трансформации. Следует отметить, что основная масса работ выполнена на морских организмах дальневосточного региона, Тихого океана и северной Атлантики, где имеется своя специфика трофических цепей, и эту информацию невозможно в полном объеме экстраполировать на черноморский регион.
- Сведения о видовом разнообразии, динамике численности черноморского фитопланктона позволяют судить о рационе питания двустворчатых моллюсков-фильтраторов на протяжении годового цикла. Знание качественного состава каротиноидов, присущего основным систематическим группам фитопланктонного сообщества, позволяет получить представление о перечне соединений данного ряда, которые утилизируют двустворки из пищевого субстрата.
- Информация же о составе каротиноидов тканей черноморских двустворчатых и брюхоногих моллюсков крайне ограничена. При помощи метода тонкослойной хроматографии и спектрального анализа (UV-VIS спектры), имеющих ограниченную разрешающую способность, предварительно изучен только качественный состав данной группы соединений у *Mytilus galloprovincialis*. В основном же преобладают сведения о суммарном содержании каротиноидов. Это не позволяет оценить процессы метаболической трансформации соединений каротиноидного ряда в трофической цепи «фитопланктон → моллюск-фильтратор → хищник» и судить об их функциональной значимости.

3.2. Сравнительная оценка состава и содержания каротиноидов в тканях моллюсков-фильтраторов

В настоящем разделе работы представлен материал по содержанию и качественному составу каротиноидов в суммарных и тканевых экстрактах (ноге, гепатопанкреасе и жабрах) трех видов двустворчатых моллюсков: *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Crassostrea gigas* Th., *Anadara inaequalis* Br. Следует отметить, что материал был получен одновременно на Экспериментальной плантации ИнБЮМ НАН Украины (район Мартыновой и Карантинной бухт, г. Севастополь). Это позволяет исключить из рассмотрения влияние условий среды и субстратов питания на формирование спектра каротиноидов в тканях этих животных. В этом случае различия в составе каротиноидных пигментов тканей моллюсков будут определяться исключительно процессами аккумуляции и метаболической трансформации данных соединений.

3.2.1. Содержание и состав каротиноидов *M. galloprovincialis*

Mytilus galloprovincialis Lam. – массовый черноморский вид, широко представленный в шельфовой зоне Черного и Азовского морей. Является объектом культивирования. У моллюска хорошо выражен цветовой полиморфизм раковины.

Глава 3

Этому вопросу будет посвящен следующий раздел работы. В настоящем же подразделе сравнительный анализ спектра каротиноидов тканей с другими видами двустворок проводится без учета этого фактора. Характер распределения каротиноидов в тканях моллюсков показан на рисунке 3.6 [Бородина, 2013].

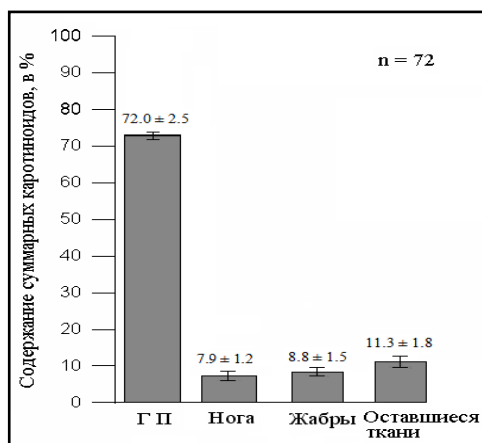


Рис. 3.6. Относительное содержание каротиноидов в тканях мидий

Максимальный уровень установлен для гепатопанкреаса (более 70 %). Он в 6-9 раз превышал величины, отмеченные для ноги и жабр моллюсков (7,5-11,5 %). Следует отметить, что абсолютные значения содержания каротиноидов в теле мидий, отмеченные в настоящей работе (17-20 мг 100 г⁻¹ сырого веса), были близки к полученным другими авторами [Goodwin, 1984; Поспелова, 2008].

Идентификация каротиноидов при помощи ТСХ, UV-VIS спектров и качественных реакций. Пример ТСХ в системе ацетон : гептан (3:7) при температуре 22⁰ С приведен на рисунке 3.7.

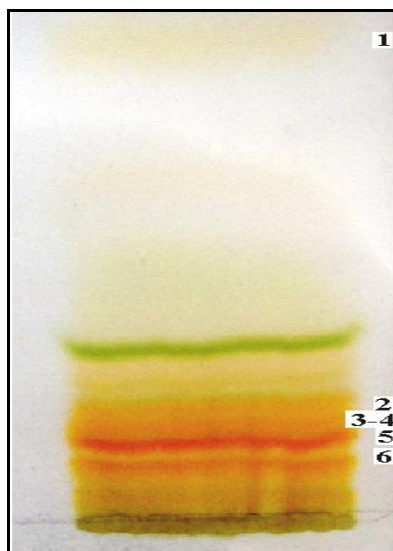


Рис. 3.7. ТСХ каротиноидов суммарных экстрактов тканей *Mytilus galloprovincialis* в системе ацетон: гептан (3:7).

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Визуально можно различить от 7 до 15 полос. Однако для последующего спектрального анализа удалось полноценно элюировать только 6 фракций. Они имели следующие цветовые характеристики и величины R_f :

- 1 – желтый пигмент с R_f – 0,89;
- 2 – оранжевый минорный пигмент с R_f – 0,39;
- 3-4 – желтый сдвоенный пигмент с R_f – 0,34;
- 5 – красный пигмент с R_f – 0,31;
- 6 – желтый пигмент с R_f – 0,24.

После выделения фракций были изучены их спектры в ацетоне и гексане в видимой области (рис. 3.8).

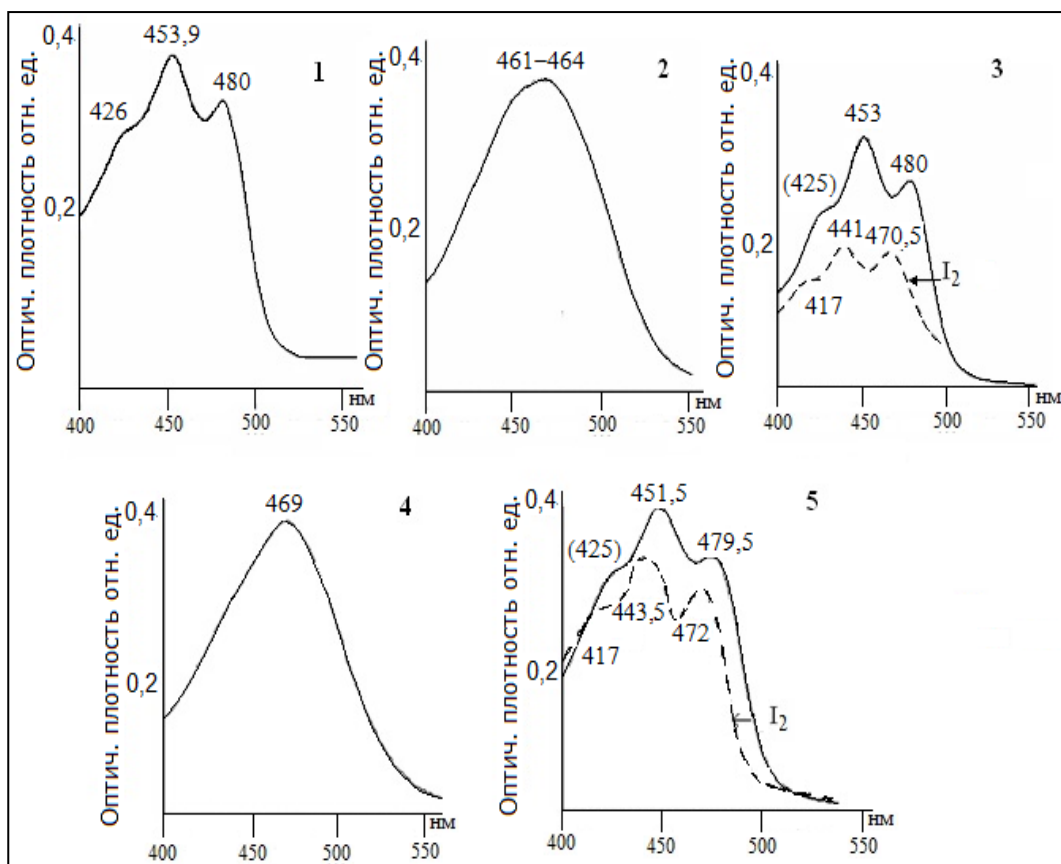


Рис. 3.8. Спектры в видимой области фракций, выделенных при помощи ТСХ (1 – 1 фракция – ацетон, 2 – 2 фракция - ацетон, 3 – комплекс фракций 3-4 – гексан, 4 – 5 фракция – ацетон, 5 – 6 фракция – гексан; на 3 и 5 показаны спектры без и после взаимодействия с йодом)

Анализ спектров и сопоставление их с известными для ряда каротиноидов [Matsuno, Maoka, 1981(в); Maoka, Matsuno, 1988; Britton et al., 1995], учет величин R_f и проведение качественных реакций на отдельные функциональные группы позволили предположительно идентифицировать во фракциях следующие виды каротиноидов: β -каротин, пектенолон, аллоксантин, диатоксантин, митилоксантин и пектенол А.

Фракция 1 с $R_f = 0,89$ имела характерные для β -каротина R_f и спектр в видимой области (ацетон) с максимумами 426; 453,5; 480 нм.

Фракция 2 с $R_f = 0,36$ имела один максимум в видимой области (461-464 нм в ацетоне и 459-462 нм в гексане), что характерно для *пектенолона*. Проведение качественных реакций с йодом подтвердило наличие сопряженных двойных связей в этом пигменте.

Комплекс фракций 3-4. Предположили, что он образован *аллоксантином* и *диатоксантином*. Из-за отсутствия четкого разделения между фракциями их изучали в смеси. Известно, что окраска, молекулярная структура и физико-химические свойства этих каротиноидов близки [Matsuno, Maoka, 1981(б, в); Hertzberg et al., 1988; Britton et al., 1995]. Спектры видимой области также имеют сходный профиль и расположение максимумов: аллоксантин в гексане имеет максимумы 451, 480 нм [Davies et al., 1984], а диатоксантин – 450, 479 нм [Davies et al., 1984]. Как уже отмечалось, в наших экспериментах смесь этих пигментов имела $R_f = 0,34$, а максимумы спектров в видимой области (гексан) располагались в районе (425); 453; 480 нм.

Качественная реакция с йодом подтвердила наличие сопряженных двойных связей. Максимумы (гексан) смещались: (417); 441; 470,5 нм. Реакция с NaBH_4 (в метаноле) не привела к изменениям в видимом спектре, подтвердив отсутствие кето-групп в молекуле. После проведения реакции ацилирования при повторной ТСХ, подвижность образовавшегося пигмента была снижена относительно первоначальной смеси каротиноидов, что подтвердило наличие гидрокси-групп в молекулах исследуемых пигментов. Полученная информация и сравнение ее с известной для *M. edulis* [Hertzberg et al., 1988], подтвердили, что в состав 3-4 фракций каротиноидов с $R_f = 0,34$ входят одновременно аллоксантин и диатоксантин.

Во фракции 5 с $R_f = 0,31$, следующей за комплексом 3-4, был идентифицирован *митилоксантин*. Для его идентификации были использованы спектр видимой области, снятый в ацетоне (максимум – 469 нм), а также качественная реакция на наличие кето-группы (реакция с NaBH_4). Полученные результаты были сопоставлены с имеющейся информацией [Matsuno, Maoka, 1981(в)], что подтвердило правильность идентификации.

Фракция 6 с $R_f = 0,24$ при растворении в гексане давала спектры (425; 451,5; 479,9 нм), описанные для 3,4,3' – тригидрокси- 7',8' – дидегидро- β – каротина [Matsuno, Maoka, 1981(б, в)], который также известен как *пектенол А* [Francis et al, 1970]. Для него характерно смещение спектра при взаимодействии с йодом (в гексане): 417; 443,5; 471 нм [Matsuno, Maoka, 1981(б, в)]. После проведения реакции ацилирования, при повторном хроматографировании, наблюдалось также смещение R_f , что подтверждает наличие гидрокси-групп в молекуле.

Идентификация каротиноидов при помощи HPLC, FAB MS, H'-NMR. Для более подробного исследования состава каротиноидов использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Чтобы получить полное разделение пигментов применяли 2 системы растворителей: сначала ацетон : гексан (25:75) (от 0 до 20 мин), затем те же растворители в соотношении 40:60 (после 20 мин). Полученная HPLC – хроматограмма представлена на рисунке 3.9.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

После HPLC разделения пигментов их идентификация была проведена при помощи спектров в видимой области (в Et₂O) (рис. 3.10) и масс-спектров (FAB MS) (табл. 3.3). Следует отметить, что изучение спектров в видимой области было недостаточным для однозначной идентификации каротиноидов, так как в ряде случаев они абсолютно совпадали (позиции 1, 2, 4). Полная идентификация возможна только с применением FAB MS. Такой подход позволил дополнительно к результатам, полученным при помощи ТСХ метода, идентифицировать еще 7 мажорных каротиноидов: крассотреаксантин, фукоксантин, гетероксантин, 19'-гексаноилоксигалацантиаксантин, фукоксантинол, галацантиаксантин, 19'-гексаноилоксифукоксантинол.

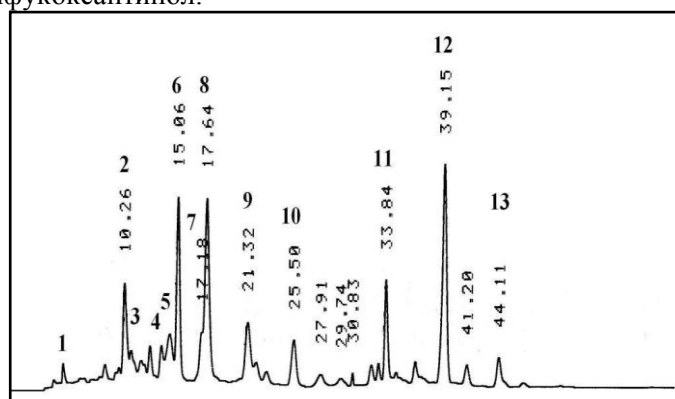


Рис. 3.9. HPLC суммарного экстракта тканей мидий (1 – β -каротин, 2 – крассотреаксантин, 3 – пектенон, 4 – диатоксантин, 5 – аллоксантин, 6 – митилоксантин, 7 – 19'-гексаноилоксигалацантиаксантин, 8 – галацантиаксантин, 9 – пектенол А, 10 – фукоксантин, 11 – 19' гексаноилоксифукоксантинол, 12 – гетероксантин, 13 – фукоксантинол

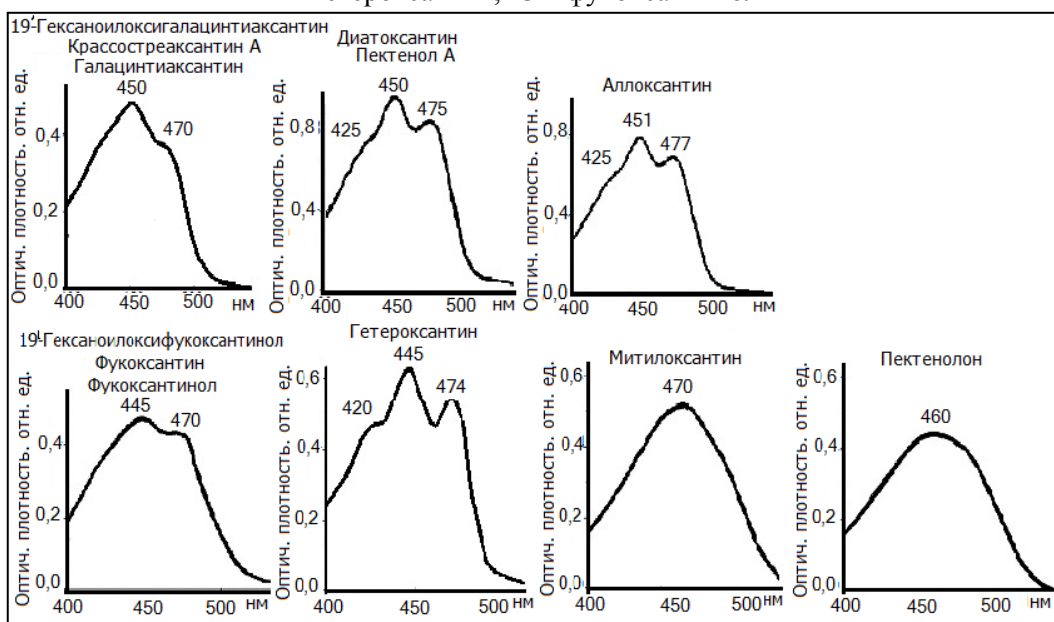


Рис. 3.10. Спектры видимой области 12 каротиноидов (*M. galloprovincialis*)

Глава 3

Анализ состава минорных компонентов, которые на HPLC не обозначены, при помощи спектров в видимой области (Et₂O) и FAB MS позволил выделить еще 7 пигментов: пирроксантинол, 8'-апоаллоксантинол, 19'-гексаноилоксифукоксантин, 19'-гексаноилоксиалленикмителилоксантин, 19'-гексаноилоксимителилоксантин, 19'-гексаноилоксикрассостреаксантин А, перидинин (табл. 3.3). Таким образом, в суммарных экстрактах тканей *M. galloprovincialis* всего было идентифицировано 20 каротиноидов, что составляет более 99 % от общего содержания.

Таблица 3.3
Состав и процентное соотношение каротиноидов в теле *M. galloprovincialis*

Название каротиноидов	Содержание, %	FAB MS M ⁺	UV-VIS (Et ₂ O)
β-каротин	0,5	536	425, 449, 475
8'-апоаллоксантинол	0,5	430	450, 470
Крассостреаксантин А	6,0	598	450, 470
19'-гексаноилоксикрассостреаксантин А	1,0	712	450, 470
Пектенолон	3,5	580	460
Диатоксантин	4,4	566	425, 450, 475
Аллоксантин	4,5	564	425, 451, 477
Мителилоксантин	11,5	598	470
19'-гексаноилоксимителилоксантин	1,0	712	464
Галацинтиаксантин	17,6	598	450, 470
19'-гексаноилоксигалацинтиаксантин	2,2	712.4696	450, 470
Пектенол А	6,4	582	425, 450, 475
Фукоксантин	3,1	658	445, 470
19'-гексаноилоксифукоксантин	0,5	792	445, 470
Гетероксантин	17,2	600	420, 445, 474
Фукоксантинол	7,2	616	445, 470
19'-гексаноилоксифукоксантинол	6,9	730	445, 470
19'-гексаноилоксиалленикмителилоксантин	2,5	730.4783	464
Перидинин	1,5	630	453, 482
Пирроксантинол	1,5	570	447, 475
Неидентифицировано	0,5	-	-

На основании HPLC метода был определен не только состав, но и процентное соотношение выявленных каротиноидов в суммарном экстракте тканей моллюсков (табл. 3.3). Наиболее высокое относительное содержание отмечено для

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

митилоксантина, галацантиаксантина, гетероксантина, уровень которых в сумме достигал 46,3 %.

Из 20 идентифицированных стандартными методами каротиноидов следует отметить шесть 19'-гексаноилокси-каротиноидов, из которых три были описаны ранее в тканях других моллюсков: 19'-гексаноилоксимитилоксантин, 19'-гексаноилоксифукоксантин и 19'-гексаноилоксифукоксантинол [Hertzberg et al., 1988; Partali et al., 1989; Kitamura et al., 1996]. Остальные три: 19'-гексаноилоксигалоцантиаксантин, 19'-гексаноилоксикрассостреаксантин А, 19'-гексаноилоксиалленикмитилоксантин, обнаружены нами впервые. Их FAB MS и спектры в видимой области (Et_2O) представлены на рисунке 3.11.

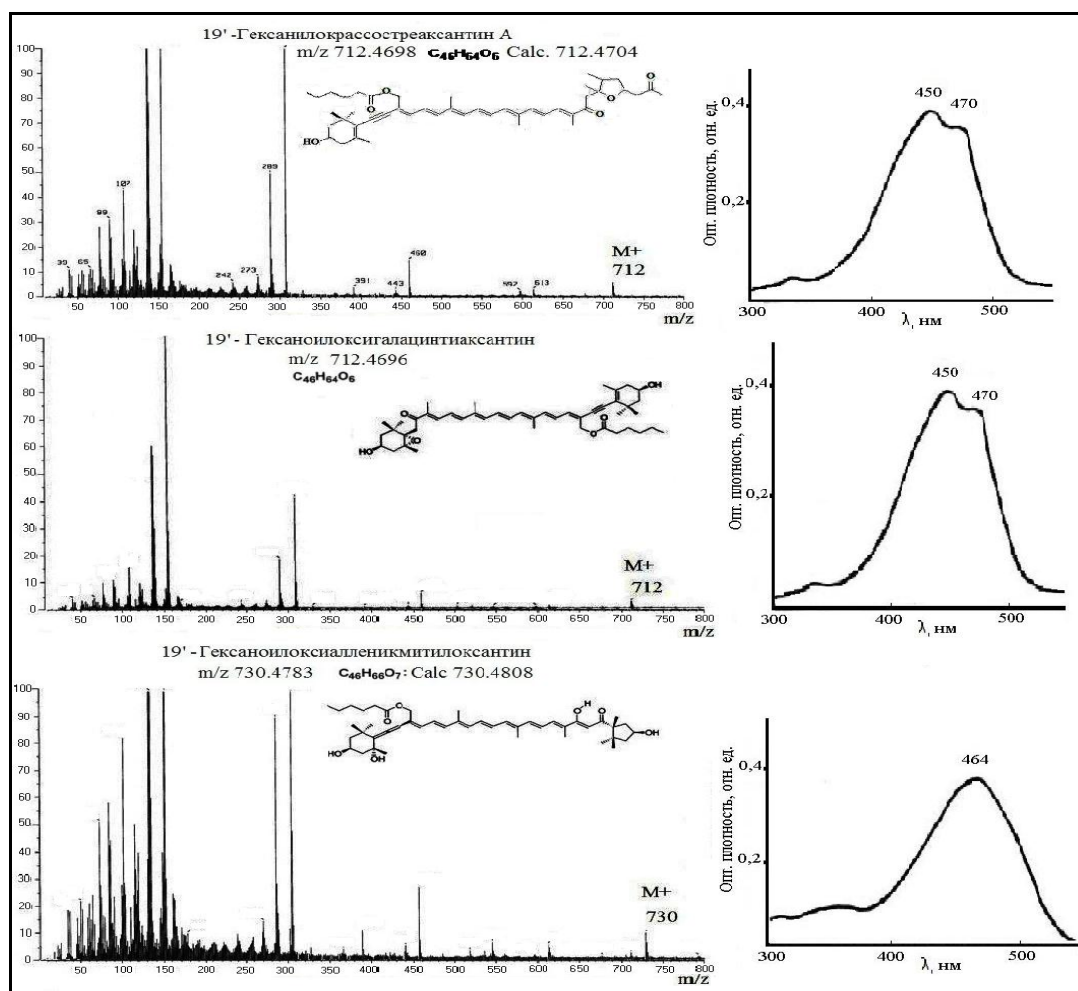


Рис. 3.11. FAB MS и спектры в видимой области (Et_2O) для трех новых каротиноидов

На рисунке 3.12 показаны также структурные формулы этих каротиноидов, полученные при помощи $^1\text{H-NMR}$ метода. Считается, что они являются производными 19'-гексаноилофукоксантинола и 19'-гексаноилофукоксантина, ранее обнаруженными у *M. edulis* [Maoka et al., 2011].

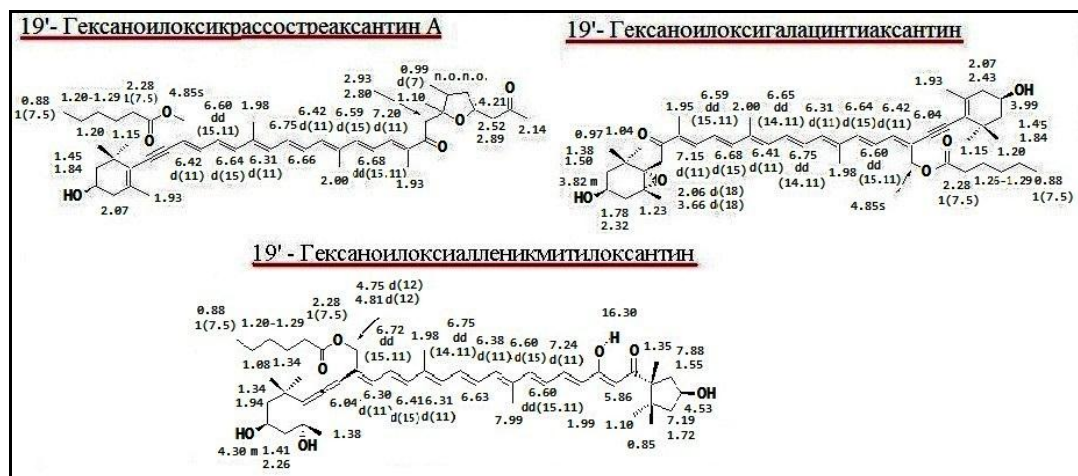


Рис. 3.12. Структурные формулы (на основе $^1\text{H-NMR}$) для трех новых каротиноидов

Таким образом, по результатам, представленным в подразделе 3.2.1, можно сделать ряд обобщений.

- При помощи ТСХ, спектров в видимой области и качественных химических реакций в суммарных экстрактах тканей *M. galloprovincialis* удалось определить 6 каротиноидов: β -каротин, пектенолон, аллоксантин, диатоксантин, митилоксантин и пектенол А.
- Применение HPLC, FAB MS, $^1\text{H-NMR}$ позволило дополнительно идентифицировать в тканях мидий 2 мажорных: галацантиаксантин, гетероксантин, и 12 минорных каротиноидов: крассотреаксантин А, 19'-гексаноилксигалацантиаксантин, 19' гексаноилксифукоксантинол, 19'-гексаноилксифукоксантин, фукоксантин, фукоксантинол, перидинин, 19'-гексаноилксикрассостреаксантин А, 19'-гексаноилксимитилоксантин, 19'-гексаноилксиалленикмитилоксантин, 8'-апоаллоксантинол, пирроксантинол (всего 20 каротиноидов), что составило более 99 % от общего содержания.
- Впервые в минорном количестве идентифицированы 3 новых 19'-гексаноилкси-каротиноида: 19'-гексаноилксигалацантиаксантин, 19'-гексаноилксикрассостреаксантин А, 19'-гексаноилксимитилоксантин. Допускается, что они являются производными 19'-гексаноилофукоксантина и 19'-гексаноилофукоксантинола, ранее обнаруженными у *M. edulis*.
- К основной группе каротиноидов в тканях мидий относятся: митилоксантин (11,5 %), галацантиаксантин (17,6 %), гетероксантин (17,2 %), пектенол А (6,4 %), диатоксантин (4,4 %), и аллоксантин (4,5 %), что составило более 60 % от суммы каротиноидов.

3.2.2. Содержание и состав каротиноидов *C. gigas*

Crassostrea gigas Th. – сравнительно новый объект культивирования для черноморского региона [Иванов, 2007]. Естественных скоплений не образует. Завозится из французских питомников (диплоидные и триплоидные формы) и

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Дальнего востока России. Хорошо адаптируется к условиям Черного моря, проявляя выраженную эвригалинность. Отличается высокими скоростями роста, в связи с чем имеет коммерческую перспективу [Иванов, 2007]. В настоящем разделе представлена информация по содержанию и составу каротиноидов в тканях диплоидных и триплоидных форм *Crassostrea gigas* Th., полученных с плантациями ООО «Яхонт Ltd.» и питомника ИнБИОМ НАН Украины.

Содержание суммарных каротиноидов в тканях Crassostrea gigas Th. Максимальное содержание каротиноидов в суммарных экстрактах тканей отмечали у моллюсков, доставленных из района Кацевели (ООО «Яхонт Ltd.»). У диплоидных форм оно составило $10,8 \pm 1,5$ мг·100 г⁻¹, а у триплоидных – $12,7 \pm 1,6$ мг·100 г⁻¹. Устрицы, доставленные из питомника ИнБИОМ НАН Украины, имели крайне низкий уровень данных соединений – $1,5 \pm 1,5$ мг·100г⁻¹.

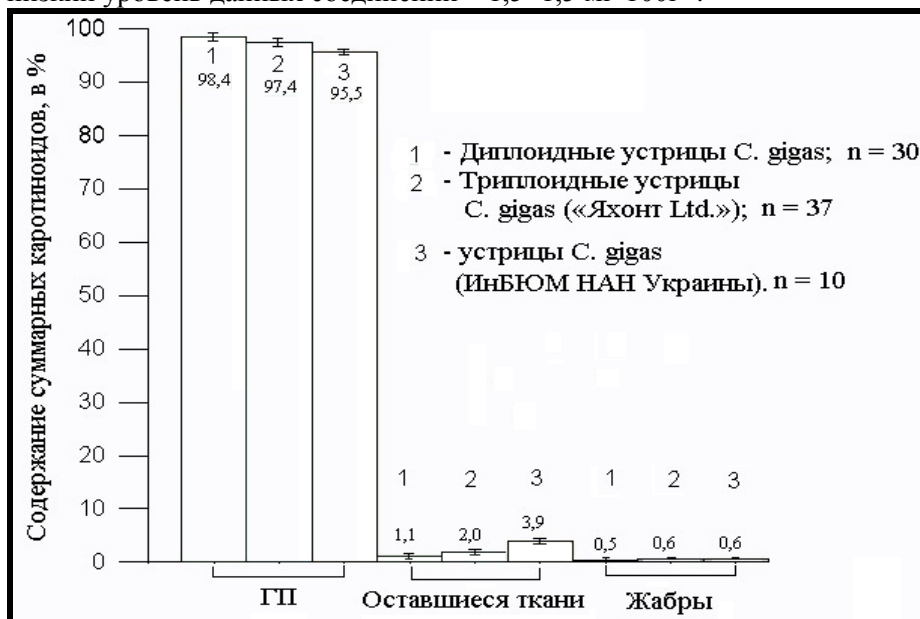


Рис. 3.13. Относительное содержание каротиноидов в тканях устриц, с учетом весовых характеристик органов (ГП – гепатопанкреас)

Характер относительного распределения каротиноидов в органах моллюсков представлен на рисунке 3.13. Наиболее высокое содержание отмечали в гепатопанкреасе. Оно составило 95,5-98,4 % от общего количества пигментов. Минимальные значения были отмечены для жабр – 0,5-0,6 %. Доля остальных тканей не превышала 4 % (1,1-3,9 %). Достоверных различий в характере тканевого распределения каротиноидов между тремя группами *C. gigas* выявлено не было.

Идентификация каротиноидов при помощи ТСХ, спектров UV-VIS и качественных реакций. Исследования качественного состава каротиноидов устриц первоначально проводили методом ТСХ. Внешний вид хроматограмм, полученных для суммарных экстрактов тканей устриц, показан на рисунке 3.14.

Здесь обозначены 7 мажорных фракций каротиноидов, которые были общими как для диплоидных, так и для триплоидных форм *C. gigas*, независимо от места выращивания. Характер окраски и величины R_f для трех групп устриц также совпадали:

- 1 – желто-оранжевая с R_f 0,39;
- 2 – 4 – смесь зеленой и желто-оранжевых фракций с R_f 0,34 – 0,30;
- 5 – желтая с R_f 0,29;
- 6 – оранжево-желтая с R_f 0,21;
- 7 – желтая с R_f 0,18.

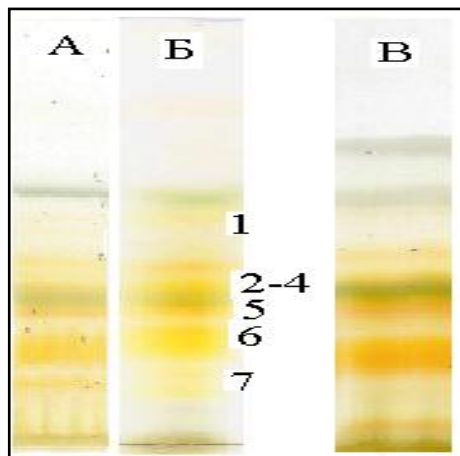


Рис. 3.14. ТСХ суммарных экстрактов каротиноидов устриц при 20° С (А – диплоиды; Б-триплоиды; В – устрицы ИнБЮМ НАН Украины).

Необходимо отметить, что содержание каротиноидов в тканях устриц, в сравнении с другими видами черноморских двустворок, было низким. Особенно у животных, полученных из питомника ИнБЮМ НАН Украины. Метод ТСХ не позволил четко разделить 2-4-ый компоненты. Границы пятого компонента также были размыты. Некоторые проблемы были и с разделением 6-го и 7-го компонентов. Это не позволило однозначно прописать UV-VIS спектры и поставить качественные реакции. Поэтому для дальнейшей идентификации пигментов был применен комплекс HPLC, FAB MS, $^1\text{H-NMR}$ методов.

Идентификация при помощи HPLC, FAB MS, $^1\text{H-NMR}$. На рисунке 3.15 представлена HPLC суммарного экстракта тканей устриц. Применение HPLC метода дало возможность более четкого разделения фракций 2-5, 6-7, полученных посредством ТСХ. Порядковый номер каротиноида, указанный на ТСХ (рис. 3.14), соотнесен с последовательностью времени регистрации пика поглощения при 450 нм, которое указано на HPLC. У выделенных каротиноидов были дополнительно исследованы спектры поглощения в видимой области (в диэтиловом эфире), масс-спектры и $^1\text{H-NMR}$ спектры. Это позволило окончательно идентифицировать 6 каротиноидов: красостреаксантин А, В; аллоксантин; диатоксантин; пектенол А и галоцинтиаксантин. Одна из фракций оказалась хлорофиллом *a*.

Спектры каротиноидов в видимой области представлены на рисунке 3.16. Из них видно, что красостреаксантины А и В, а также галоцинтиаксантин имеют одинаковые максимумы поглощения и сходный профиль спектра. Это означает, что идентификация данных каротиноидов только на основании их спектров поглощения в видимой области невозможна. Поэтому в дополнение к этому применили FAB MS и $^1\text{H-NMR}$ методы.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

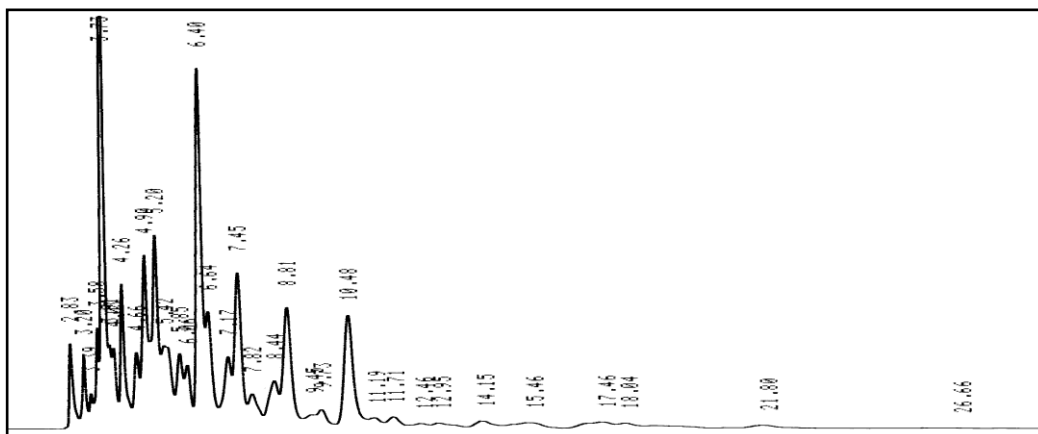


Рис. 3.15. HPLC суммарного экстракта тканей *Crassostrea gigas*: 3,73 - хлорофилл а; 4,90 - красостреаксантин А; 6,40 – аллоксантин; 6,64 – диатоксантин; 7,45 - красостреаксантин В; 8,81 - галацантиаксантин; 10,48 – пектенол А

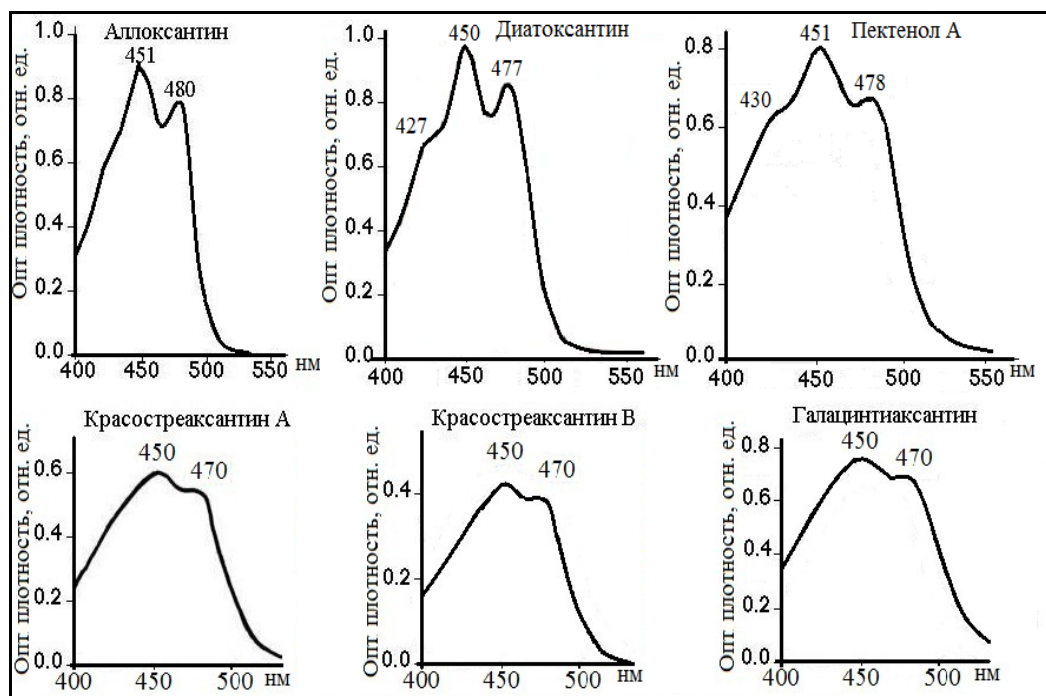


Рис. 3.16. Спектры поглощения в видимой области в диэтиловом эфире для каротиноидов устриц

Результаты FAB MS и H^1 -NMR 6-и выделенных каротиноидов представлены в виде таблицы 3.4 и рисунков 3.17 и 3.18.

Полученные данные подтвердили результаты предшествующей идентификации каротиноидов посредством HPLC и UV-VIS спектрометрии, то есть в тканях *C. gigas* в значительных концентрациях присутствуют красостреаксантин А и В, аллоксантин, диатоксантин, галоцантиаксантин и пектенол А.

Таблица 3.4

Спектральные характеристики каротиноидов, выделенных из суммарного экстракта тканей *Crassostrea gigas*

Виды спектров	Виды каротиноидов											
	Ал.		Дт.		Кр. А		Кр. В		П. А		Гал.	
MS, m/z	564		566		598		598		582		598	
¹ H-MR	мульти. (JВГЦ)		мульти. (JВГЦ)		мульти. (JВГЦ)		мульти. (JВГЦ)		мульти. (JВГЦ)		мульти. (JВГЦ)	
1	2		3		4		5		6		7	
2	1,41	dd(12,12)	1,48	dd(12,12)	1,48	dd(12,12)	1,48	dd(12,12)	1,57	dd(13,4)	1,36	dd(13,12)
	1,84	ddd(12,4,2)	1,86	ddd(12,4,2)	1,86	ddd(12,4,2)	1,86	ddd(12,4,2)	1,69	dd(13,13)	1,50	ddd(13,4,2)
3	3,99	m	4,01	m	4,01	m	4,01	m	3,88	m	3,82	m
4	2,03	dd(18,10)	2,09	dd(18,10)	2,09	dd(18,10)	2,09	dd(18,10)	3,94	d(3,5)	1,79	dd(14,9)
	2,43	ddd(18,6,2)	2,46	ddd(18,6,2)	2,46	ddd(18,6,2)	2,46	ddd(18,6,2)			2,33	ddd(14,5,2)
7									6,09	d(16)	2,60	d(18)
8									6,17	d(16)	3,66	d(18)
10	6,46	d(11)	6,30	d(11)	6,30	d(11)	6,30	d(11)	6,17	d(11)		
11	6,52	dd(14,11)	6,82	dd(14,11)	6,82	dd(14,11)	6,82	dd(14,11)	6,65	dd(14,11)	7,15	d(11)
12	6,36	d(14)	6,35	d(14)	6,35	d(14)	6,35	d(14)	6,38	d(14)	6,58	dd(15,11)
14	6,27	m	6,25	m	6,25	d(11)	6,25	m	6,25	m	6,67	d(15)
15	6,64	m	6,62	m	6,62	m	6,62	m	6,62	m	6,41	d(11)
16	1,15	s	1,19	s	1,19	s	1,19	s	1,07	s	6,64	m
17	1,20	s	1,25	s	1,25	s	1,25	s	1,09	s	1,04	s
18	1,92	s	1,97	s	1,97	s	1,97	s	1,90	s	0,96	s
19	2,01	s	2,00	s	2,00	s	2,00	s	1,96	s	1,22	s
20	1,98	s	1,93	s	1,93	s	1,93	s	1,97	s	1,95	s
2'	1,41	dd(12,12)	1,48	dd(12,12)	2,52	dd(15,5)	2,65	d(6)	1,41	dd(12,12)	1,99	s
	1,84	ddd(12,4,2)	1,77	ddd(12,4,2)	2,69	dd(15,7)	2,85	d(6)	1,84	ddd(12,4,2)	1,41	dd(12,12)
3'	3,99	m	4,00	m	4,21	m	4,20	m	3,99	m	1,84	ddd(12,4,2)
	2,43	ddd(18,6,2)	2,39	ddd(18,6,2)	2,17	ddd(12,7,5)	2,44	dd(13,8)	2,43	ddd(18,6,2)	2,03	dd(18,10)
5'					2,32	ddq(11,7,7)					2,43	ddd(18,6,2)
7'			6,10	d(11)	2,86	d(13,5)	3,51	d(17)				
					2,93	d(13,5)	3,57	d(17)				
8'			6,15	dd(14,11)								
10'	6,46	d(11)	6,15	d(11)	7,26	d(11)	7,20	d(10)	6,46	d(11)		
11'	6,52	dd(14,11)	6,64	dd(14,11)	6,59	dd(15,11)	6,62	dd(15,11)	6,52	dd(14,11)	6,46	d(11)
12'	6,36	d(14)	6,36	d(14)	6,68	d(15)	6,66	d(15)	6,36	d(14)	6,52	dd(14,11)

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

1	2		3		4		5		6		7	
14'	6,27	m	6,25	m	6,42	d(11)	6,41	d(11)	6,27	m	6,36	d(14)
15'	6,64	m	6,64	m	6,66	m	6,87	m	6,64	m	6,27	m
16'	1,15	s	1,07	s	2,14	s	2,22	s	1,15	s	6,64	m
17'	1,20	s	1,07	s	1,10	s	1,64	brs	1,20	s	1,15	s
18'	1,92	s	1,74	s	0,99	d(7)	1,68	brs	1,92	s	1,20	s
19'	2,01	s	1,97	s	1,93	s	1,95	s	2,01	s	1,92	s
20'	1,98	s	1,97	s	1,99	s	2,00	s	1,98	s	2,01	s

s: синглет, d: дуплет, q: квартет, m: мультиплет, br.s : общий синглет

Примечание: Ал – аллоксантин, Дт. – диатоксантин, ПА – пектенол А, Кр.А, Кр.В – красостреаксантины А и В, Гал. – галоцинтиаксантин

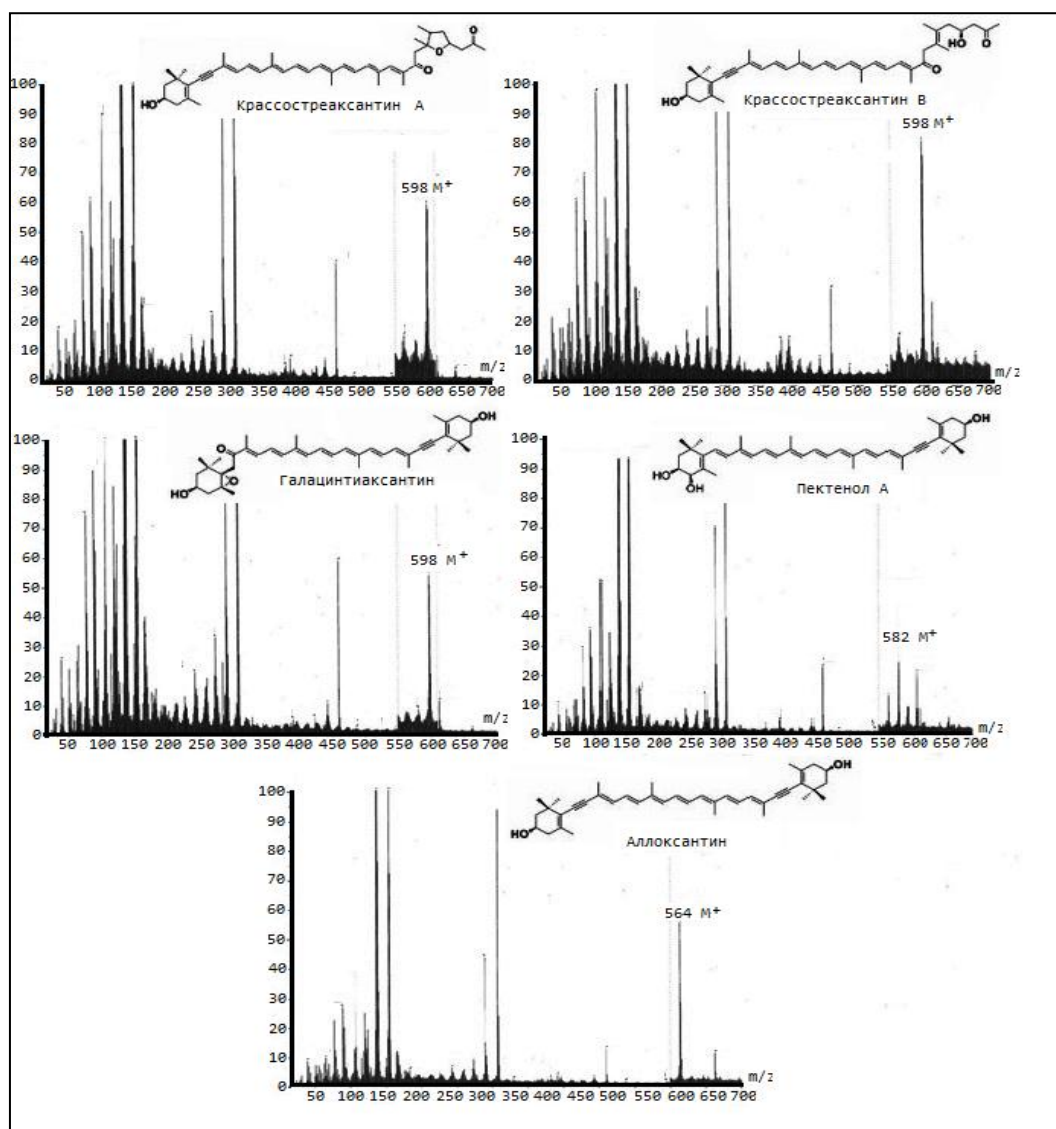


Рис. 3.17. Масс-спектры основных каротиноидов *Crassostrea gigas*

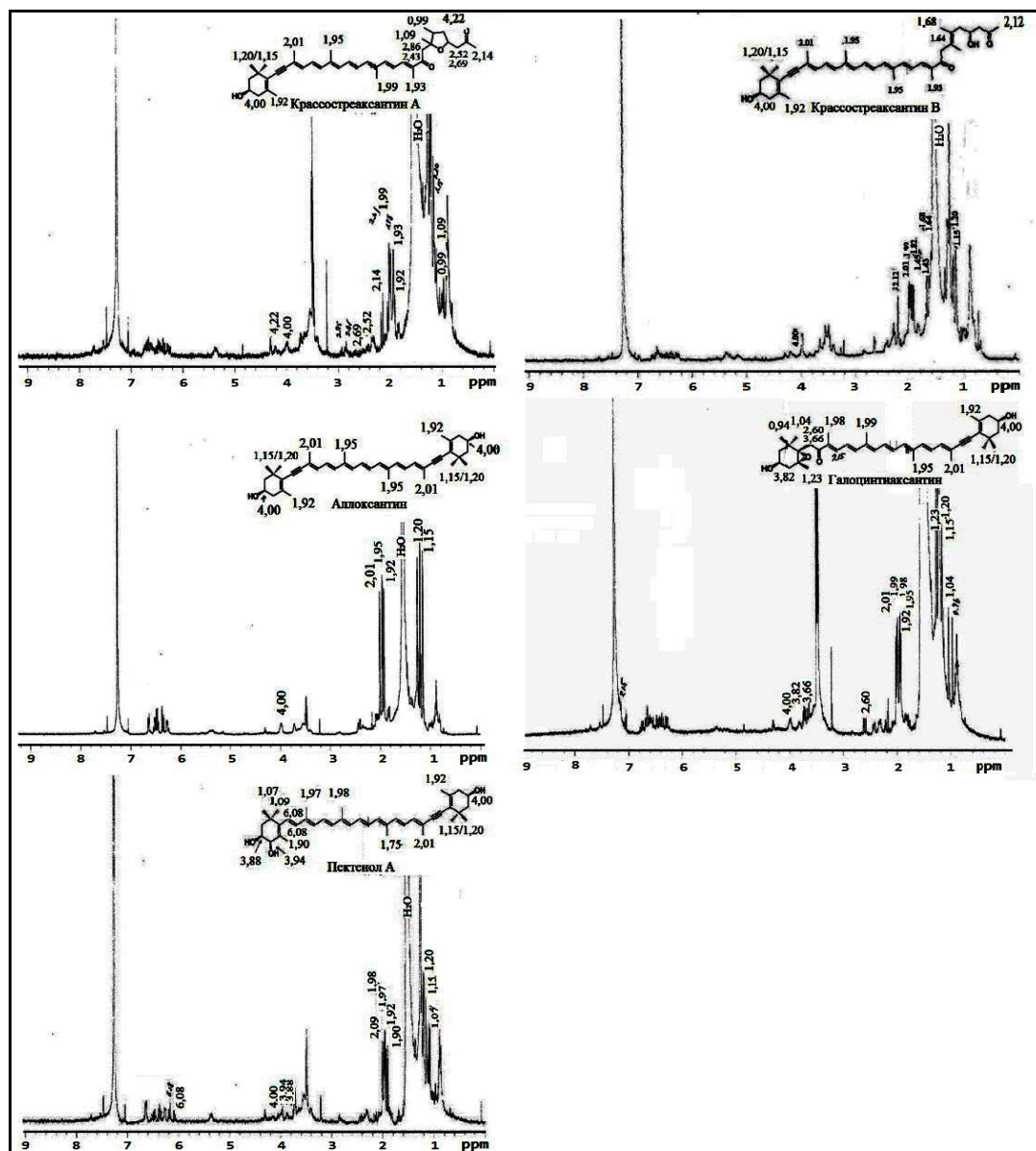


Рис. 3.18. Спектры протонного магнитного резонанса основных каротиноидов *Crassostrea gigas*

Спектральные характеристики этих каротиноидов были сопоставлены с известными для *C. gigas*, обитающими в Тихом океане [Fujiwara et al., 1992; Maoka et al., 2001; Britton et al., 2008], что подтвердило правильность идентификации.

Качественный состав и содержание минорных фракций каротиноидов в тканях диплоидных и триплоидных форм *C. gigas* (ООО «Яхонт Ltd.») и устриц из питомника ИнБЮМ НАН Украины не исследовали в виду низкой концентрации пигментов в пробах. Присутствие минорных компонентов и характер их разделения можно наблюдать на образцах ТСХ и частично – на HPLC, в виде пиков незначительных по амплитуде, которые представлены выше (рис. 3.14-15).

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Основной состав каротиноидов черноморских интродуцентов *Crassostrea gigas* Th. был идентичен составу каротиноидов тихоокеанских устриц *Crassostrea gigas* Th., однако наблюдались и существенные отличия в содержании доминирующих фракций. Так, у тихоокеанских устриц к последним можно отнести галацантиаксантин и митилоксантин, которые составляли 25 % и 12 % от суммы каротиноидов [Маока et al., 2001; 2005]. У черноморских моллюсков концентрация галацантиаксантина не превышала 10 %, а митилоксантина была минимальной и не обнаруживалась в основном составе. С другой стороны, у черноморских моллюсков к доминирующей группе можно отнести аллоксантин (25 %) и красостреаксантины А и В (15 % и 13 % соответственно), причем их эфирных форм обнаружено не было. Отмечено также повышенное накопление диатоксантина и его производного пектенола А, в сравнении с тихоокеанскими устрицами. Такие различия в накоплении каротиноидов в тканях *Crassostrea gigas* Th. могут быть связаны как с изменением спектра питания, так и с адаптацией к новым экологическим условиям.

Представленные в настоящем подразделе результаты исследования позволяют сделать ряд обобщений.

- Уровень каротиноидов в тканях *C. gigas* существенно ниже, чем у других изученных видов черноморских двустворок. Более 95 % их содержания приходится на гепатопанкреас.
- Применение метода ТСХ не позволило провести качественное разделение пигментов и последующую их идентификацию при помощи спектрального анализа в UV-VIS диапазоне и дополнительных химических реакций.
- Комплекс методов HPLC, FAB MS, ¹H-NMR дал однозначные результаты. В тканях моллюска удалось идентифицировать 6 мажорных каротиноидов: аллоксантин, красостреаксантин А и В, галоцантиаксантин, пектенол А, и диатоксантин, что составило 76±10 % от общего содержания пигментов. Остальное приходилось на минорные компоненты, идентификация которых не проводилась.
- К доминирующей группе относятся аллоксантин и красостреаксантины А и В, на которые приходится около 50 % от суммы каротиноидов тканей *C. gigas*.

3.2.3. Содержание и состав каротиноидов *A. inaequalvis*

Anadara inaequalvis Br. – двустворчатый моллюск, который характерен для малакофауны Индийского и Тихого океанов. В Средиземное море попал в 1969 году, где быстро распространился. В 1980-1982 годах был обнаружен и в Черном море [Вгоом, 1985; Анистратенко, 2006; Сон, 2009]. В настоящее время отмечается массовое оседание личинок данного вида на естественные субстраты и коллекторные установки мидийных ферм. Моллюск проявляет выраженную эврибионтность. Он способен существовать в широком диапазоне температур, соленостей, гипоксических и аноксических зонах [Сон, 2009]. Активно колонизирует проблемные акватории северо-западного шельфа Черного моря, становясь во многих случаях ценозообразующим видом [Супрунович, 1988; Сон, 2009].

Содержание суммарных каротиноидов в тканях *Anadara inaequalvis* Br. Отличительной чертой *A. inaequalvis* является хорошо развитая нога, которую моллюск использует при перемещении в грунте. На нее приходится около 40 % веса тела, что существенно выше, чем доля остальных органов (жабры, гепатопанкреас) (табл. 3.5). Несмотря на функциональную значимость гепатопанкреаса, соматический индекс данного органа был минимален – около 10 %, тогда как у других видов двустворок эта ткань явно доминировала по отношению к ноге и жабрам.

Таблица 3.5

Весовые характеристики органов *Anadara inaequalvis*

Весовые характеристики	Органы <i>A. inaequalvis</i>			
	Нога	ГП	Жабры	Остальные ткани
Вес, г	0,26 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,21 ± 0,02
Соматический индекс, %	39,1 ± 3,8	10,5 ± 1,0	21,4 ± 1,4	31,4 ± 3,5

Примечание: ГП - гепатопанкреас

Эта особенность моллюска и определила характер средневзвешенного распределения каротиноидов в тканях *A. inaequalvis* (рис. 3.19). Максимальный уровень этих соединений отмечали в ноге – около 46 %, а минимальный в гепатопанкреасе – 14 %. Достаточно неожиданным оказалось высокое содержание каротиноидов в жабрах *A. inaequalvis* – около 20 %. У мидий и устриц оно было существенно ниже.

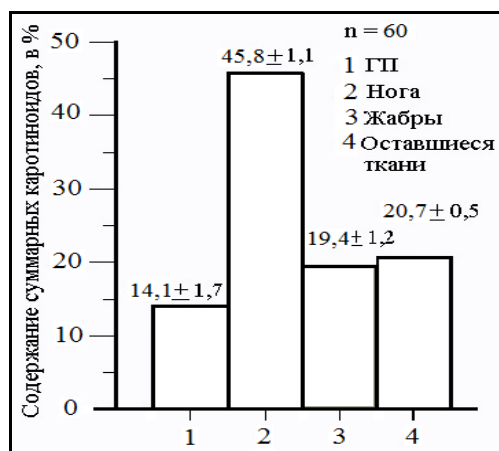


Рис.3.19. Содержание каротиноидов в тканях *Anadara inaequalvis*

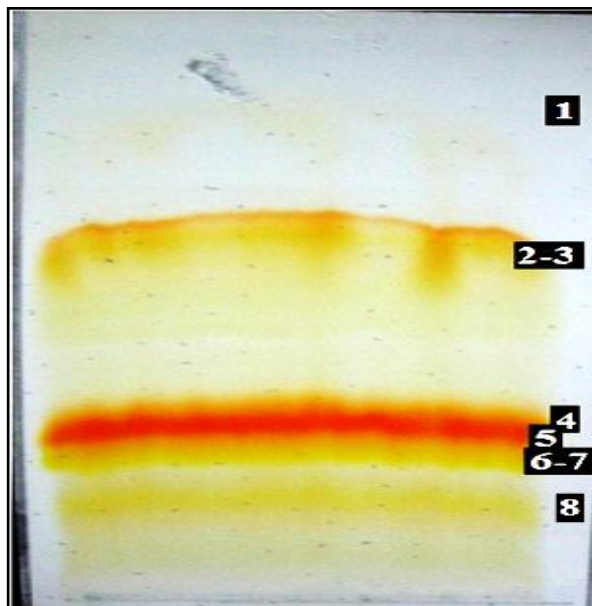
Идентификация каротиноидов при помощи ТСХ, спектров UV-VIS и качественных реакций. Анализ ТСХ хроматограмм в системе растворителей ацетон : гептан (3:7) позволил выявить 8 компонентов со следующими цветовыми характеристиками и величинами относительной подвижности фракций (R_f) (рис. 3.20):

- 1 – желтый пигмент с R_f – 0,9;
- 2 – 3 смесь розового и желтого пигментов с R_f – 0,5 -0,6;
- 4 – оранжевый пигмент с R_f – 0,45;
- 5 – оранжево-желтый с R_f – 0,43;

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

- 6 – 7 желтые пигменты с $R_f = 0,40$;
- 8 – желтый пигмент с $R_f = 0,20$.

Разделение пигментов проводилось при температуре воздуха 18-20 °С. После разделение каротиноидов их элюировали с хроматографических пластинок, используя ацетон и гексан. Растворы подвергали спектральному анализу в UV-VIS диапазоне. Анализ полученных спектров показал, что 1-ая и 8-ая фракции



соответствуют β -каротину и пектенолу А. На рисунке 3.21 показаны полученные спектры для β -каротина в ацетоне и пектенола А в гексане.

Спектры этих фракций были идентичны известным для данных видов каротиноидов [Matsuno, Маока, 1981(в)]. Для подтверждения наличия сопряженной двойной связи у пектенола А была проведена реакция его с йодом: UV-VIS спектр (в гексане) до реакции имел максимумы 425,0; 451,5; 479,5 нм, а после взаимодействия с йодом: 417,0; 443,5 и 472,0 нм, что также подтвердило правильность идентификации.

Рис. 3.20. ТСХ суммарного экстракта тканей *Anadara inaequalvis*

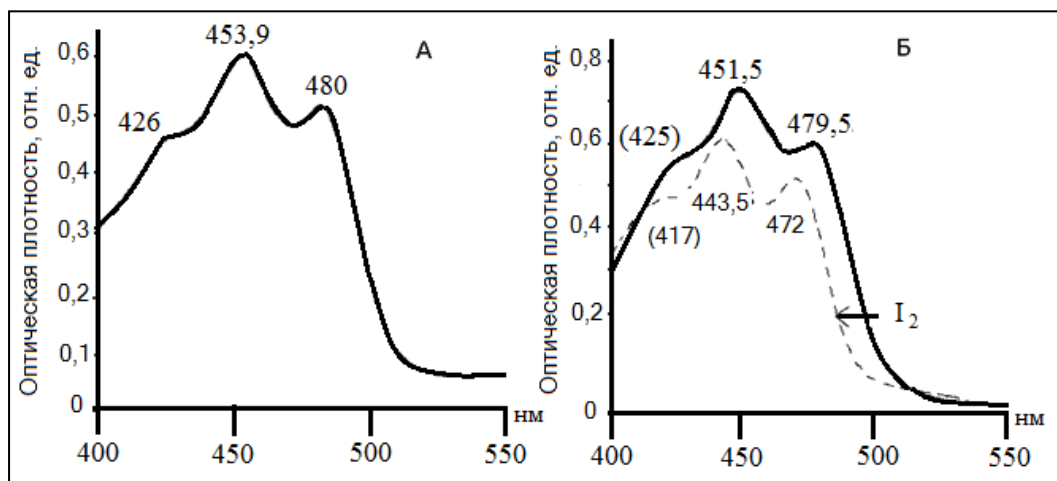
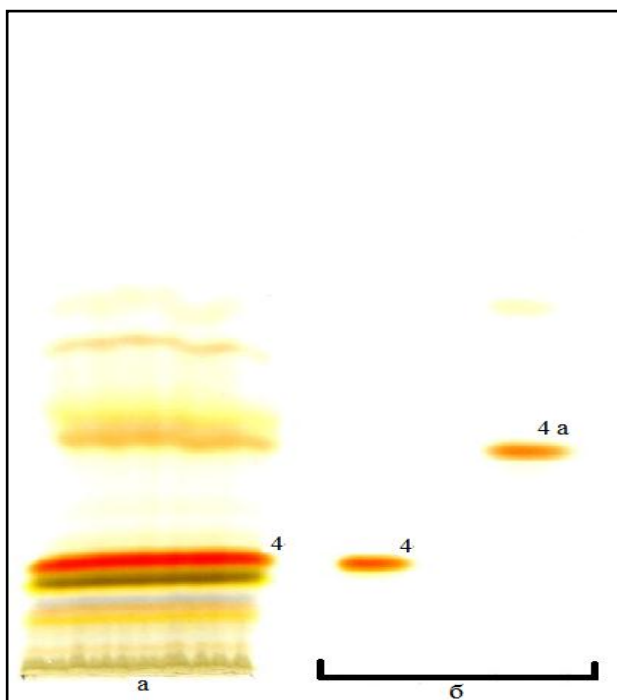


Рис. 3.21. Графическая запись спектров видимой области каротиноидов: А – β -каротина (в ацетоне) и Б – пектенола А (до и после проведения реакции с йодом в гексане)

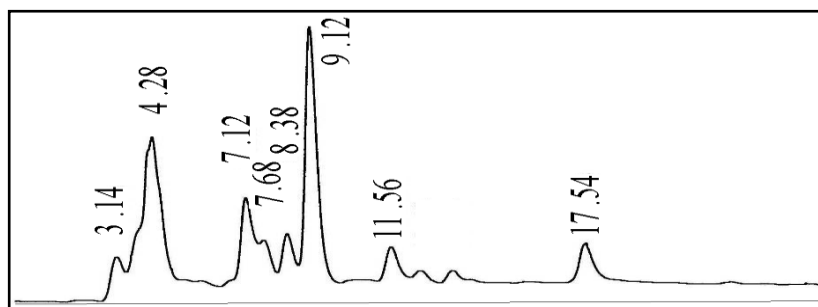


методы.

Рис. 3.22. ТСХ пигментов *Anadara inaequalvis*: (а – сумма всех каротиноидов; б – 4- фракция до и после (4а) ацилирования)

С оранжевым пигментом (4 фракция) была проведена реакция ацилирования. Это повлияло на R_f данного компонента, что подтверждает присутствие ОН-группы в исследуемом пигменте (рис. 3.22). Попытка идентификации каротиноидов в 2-7 фракциях с помощью ТСХ и спектров в видимой области не увенчалась успехом. Полученные UV-VIS спектры имели неопределенный профиль, что свидетельствовало о присутствии в растворах примесей разных каротиноидов. Это обусловило переход к следующему этапу работы, в котором были задействованы HPLC, FAB MS, $^1\text{H-NMR}$

Идентификация при помощи HPLC, FAB MS, $^1\text{H-NMR}$. На рисунке 3.23



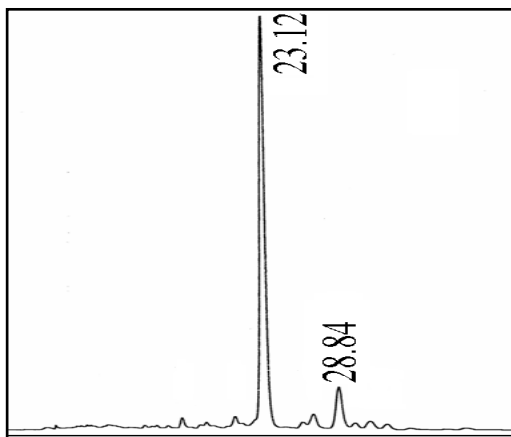
представлена HPLC каротиноидов суммарных экстрактов тканей анадары.

Рис. 3.23. HPLC хроматограмма пигментов *Anadara inaequalvis*: 3.14 – β -каротин; 4.28 – эфиры алло- и диатоксантинов, 7.12 – пектенолон, 7.68 – зеаксантин, 8.38 – диатоксантин, 9,12 – аллоксантин, 17.54 – пектенол А

При помощи этого метода удалось выделить и в дальнейшем идентифицировать 7 видов каротиноидов. Время последовательности регистрации пиков аналогично нумерации фракций каротиноидов, выделенных при помощи ТСХ (рис. 3.20).

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

С некоторыми фракциями проводили дополнительные исследования. Так, для группы сложных эфиров получали HPLC до и после реакции их омыления с использованием колонки ODS. Повторному разделению с колонкой ODS также была подвергнута фракция пектенолона, в результате чего были выявлены 2 изомерные формы этого каротиноида (рис. 3.24). Два пика соответствуют транс- и цис-изомерам



пектенолона соответственно. Из рисунка видно, что содержание транс-изомера пектенолона в 9 раз превышает содержание цис-изомера. После элюции каротиноидов был выполнен их спектральный анализ в UV-VIS диапазоне. Он подтвердил присутствие β -каротина, эфиров алло- и диатоксантина, зеаксантина, аллоксантина, диатоксантина, пектенола А и изомеров пектенолона (рис.3.25). Недостающие графики β -каротина и пектенола А были аналогичны рисунку 3.22.

Рис. 3.24. HPLC фракций пектенолона: 23.12 – транс-, 28,84 – 9-цис-изомеры пектенолона

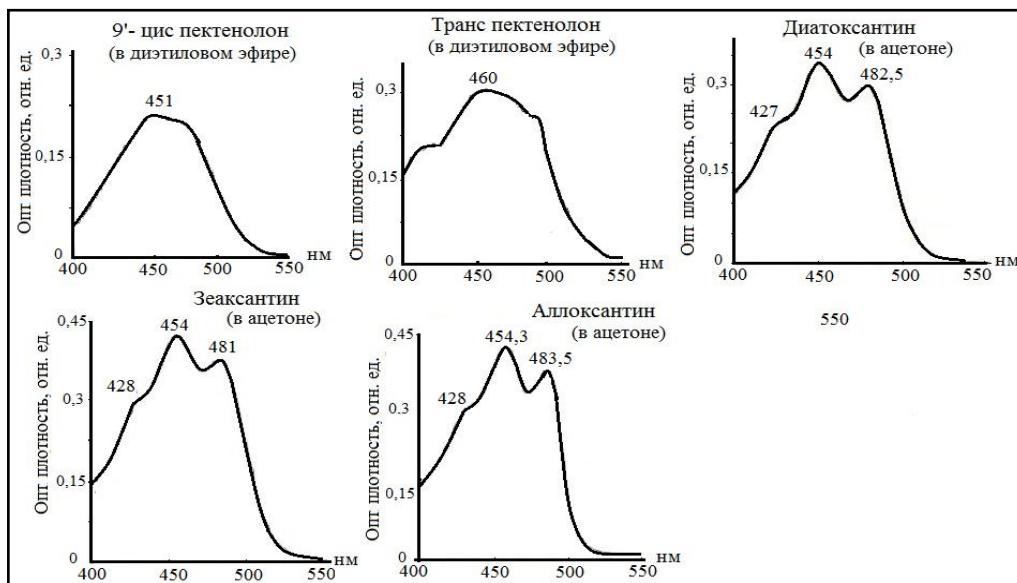


Рис. 3.25. Спектры видимой области каротиноидов *Anadara inaequalvis*, выделенных после HPLC

После разделения всех фракций пигментов (каротиноидов и их эфиров) и получения спектров в видимой области, их исследовали методом FAB MS. Этот метод позволил установить состав сложных эфиров каротиноидов, подтвердить

соответствие молекулярных весов идентифицированных пигментов и доказать наличие 2 изомеров пектенолона. Полученные результаты по составу сложных эфиров аллоксантина и диатоксантина представлены на рисунке 3.26 и в виде таблицы 3.6.

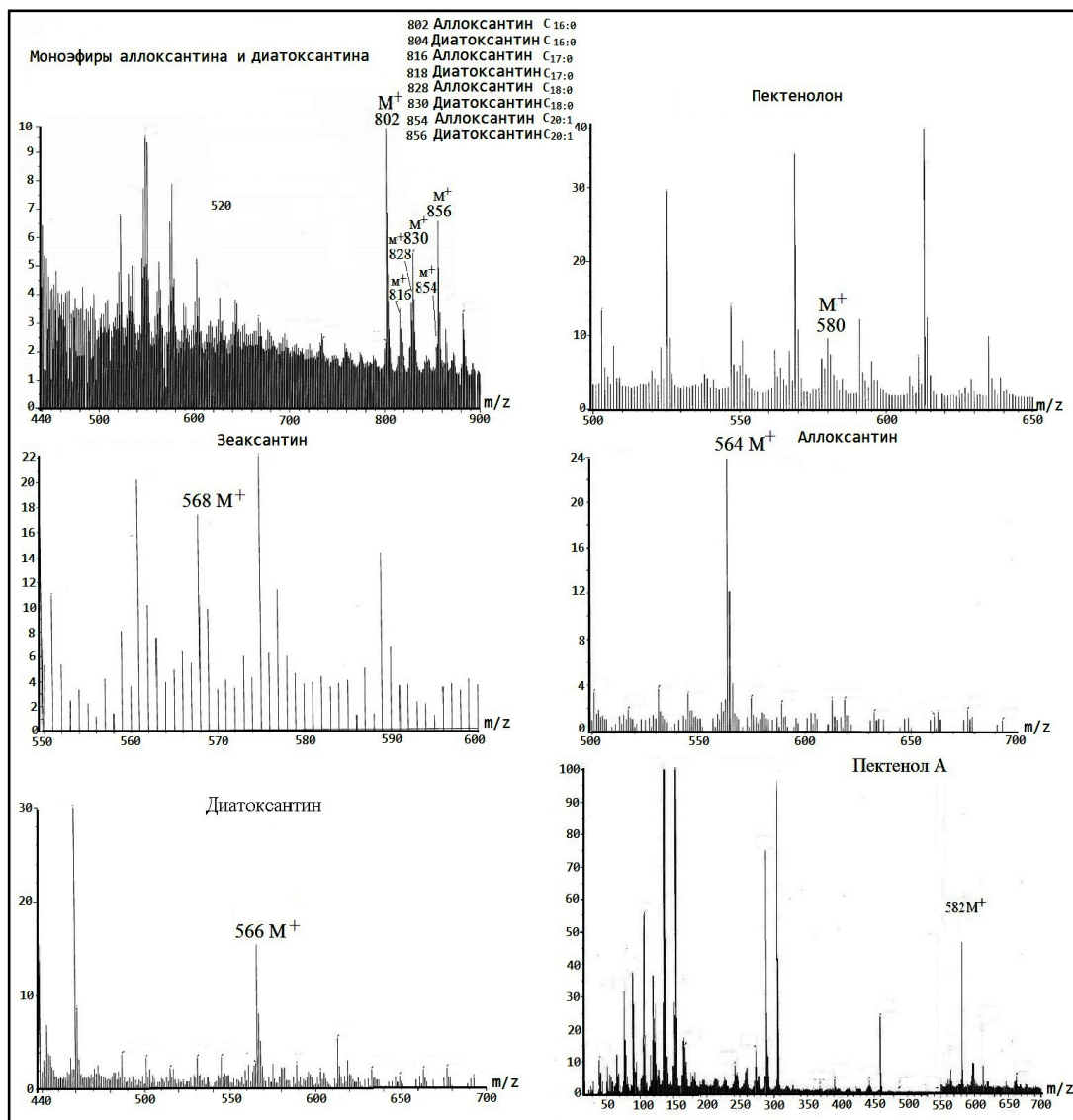


Рис. 3.26. Графики масс-спектров состава каротиноидов *Anadara inaequalvis*

В состав сложных эфиров диатоксантина и аллоксантина входят 4 карбоновые кислоты (пальмитиновая, гептадекановая, стеариновая и эйкозановая), образуя эфиры с молекулярной массой, указанной на рисунке 3.26 и в таблице 3.6, в виде значения M^+ , характеризующего отношение массы основного иона каротиноида к его заряду (m/z). На масс-спектрах каротиноидов пектенолона, зеаксантина, диатоксантина, аллоксантина и пектенола А показаны молекулярные

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

массы этих каротиноидов и положительно заряженные ион-радикалы (M^+) молекулы исследуемого пигмента (рис. 3.26).

Таблица 3.6

FAB MS сложных эфиров *Anadara inaequalvis*

Название каротиноида m/z	Карбоновая кислота, входящая в состав эфира, m/z			
	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0
Аллоксантин 564	802	816	828	856
Диатоксантин 566	804	818	830	854

Полученные результаты по качественному составу каротиноидов тканей анадары позволяют сделать ряд обобщений.

- Основным органом, накапливающим каротиноиды, у *A. inaequalvis* являлась нога. На нее приходилось более 45 % от общего уровня каротиноидов в теле моллюска, что в 2-3 раза выше, чем в остальных тканях (гепатопанкреас, жабры). Это принципиально отличает *A. inaequalvis* от остальных видов двустворок.
- При помощи ТСХ, UV-VIS спектров и качественных химических реакций в суммарных экстрактах тканей *A. inaequalvis* удалось идентифицировать 2 каротиноида: β -каротин и пектенол А.
- Применение HPLC, FAB MS, 1H -NMR методов позволило дополнительно идентифицировать в тканях анадары еще 4 каротиноида: пектенолон, зеаксантин, диатоксантин, аллоксантин, а также эфиры алло- и диатоксантинов, то есть фактически определен весь качественный состав каротиноидов тканей данного моллюска.
- Изучение фракции пектенолона методом HPLC после реакции омыления позволило определить его транс- и цис- изомеры. При этом содержание транс-формы было в 9 раз выше.
- Доминирующими каротиноидами тканей моллюска являются аллоксантин, пектенолон и эфиры алло- и диатоксантина. На них приходилось более 90 % от числа идентифицированных пигментов.

3.2.4. Каротиноиды тканей моллюсков-фильтраторов (сравнительная характеристика)

В настоящем подразделе проводится обобщение рассмотренных ранее результатов исследований. Дается сравнительная оценка содержания и состава каротиноидов в тканях трех видов двустворчатых моллюсков: *C. gigas*, *A. inaequalvis*, *M. galloprovincialis*, предлагаются схемы их метаболической трансформации.

Распределение каротиноидов в тканях моллюсков. В таблице 3.8 представлена информация о тканевой специфике распределения каротиноидов (гепатопанкреас, жабры, нога) у трех видов двустворок: *C. gigas*, *A. inaequalvis*, *M.*

Глава 3

galloprovincialis. Как видно, основная масса каротиноидов у мидий и устриц сосредоточена в гепатопанкреасе. Это очевидно, так как с этим органом связывают не только аккумуляцию данной группы пигментов, получаемых моллюском в ходе питания, но и процессы их метаболической трансформации [Холодов и др., 2010].

У анадары характер тканевого распределения пигментов был принципиально иным. Максимум отмечали в ноге – более 40 %, а минимум – в гепатопанкреасе (менее 15 %). Сравнительно высокий уровень каротиноидов показан и для жабр моллюска.

Таблица 3.8

Тканевая специфика содержания каротиноидов в тканях двустворчатых моллюсков

Вид моллюска	Содержание каротиноидов, %			
	Гепатопанкреас	Нога	Жабры	Остальные ткани
<i>C. gigas</i>	97.4 ± 1.5	-	0.6 ± 0.2	2.0 ± 0.5
<i>A. inaequivalvis</i>	14.1 ± 1.7	45.8 ± 1.1	19.4 ± 1.2	20.7 ± 0.5
<i>M. galloprovincialis</i>	72.0 ± 2.5	7.9 ± 1.2	8.8 ± 1.5	11.3 ± 1.8

Причины выявленных различий, по-видимому, следует искать в особенностях экологии этих видов. Мидии и устрицы ведут малоподвижный или прикрепленный образ жизни. Нога как орган движения у них практически не востребована. У устриц она отсутствует, а у мидий существенно редуцирована и является местом расположения биссусных желез [Холодов и др., 2010].

Анадара, напротив, обитает в придонных слоях воды с ограниченным водообменом [Broom, 1980; 1985; Анистратенко, Халиман, 2006]. Моллюск чрезвычайно подвижен, активно перемещается в толще грунта, используя ногу, зарываясь на глубину до 30-40 см [Broom, 1980; 1985; Анистратенко, Халиман, 2006]. Ранее показано, что в большинстве тканей анадары (за исключением ноги) даже в условиях нормоксии преобладают анаэробные процессы [Солдатов и др., 2008]. Стремление моллюска поддерживать здесь аэробный метаболизм свидетельствует о функциональной значимости данного органа. Из работ ряда авторов следует, что каротиноиды могут рассматриваться как метаболический источник кислорода [Бриттон, 1986; Карнаухов, 1988]. Этот аспект, а также особенности экологии анадары позволяют объяснить высокое содержание каротиноидов в ноге данного вида.

Сравнительная оценка состава каротиноидов тканей. Сравнительную оценку качественного состава каротиноидов тканей двустворчатых моллюсков (устриц, мидий и ададар) можно провести по результатам, представленным в таблице 3.9. В таблицу не вошла информация по содержанию эфиров каротиноидов из-за их неполной идентификации. Как видно, наиболее полно изучен состав каротиноидов тканей мидий. Об этом свидетельствует высокое содержание минорных компонентов. У устриц минорные компоненты не определяли. Это отражает достаточно высокий процент неидентифицированных пигментов. Согласно опубликованным данным, у данного вида выявлено 25 видов каротиноидов [Маока et al., 2001; 2005]. Поэтому сравнительная оценка будет проведена исключительно по содержанию основных функционально-значимых для организмов моллюсков каротиноидов (в таблице – «О»).

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Таблица 3.9

Качественный состав каротиноидов тканей двустворчатых моллюсков

Виды каротиноидов	Виды моллюсков		
	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>A. inaequalvis</i>	<i>C. gigas</i>
β каротин	М	М	-
8'-Апоаллоксантинал	М	-	-
Крассостреаксантин А	М	-	О
Крассостреаксантин В	-	-	О
19'-Гексаноилокси-крассостреаксантин А	М	-	-
Транс-пектенолон	М	О	-
Цис- пектенолон	-	М	-
Диатоксантин	О	О	О
Аллоксантин	О	О	О
Митилоксантин	О	-	-
19'-Гексаноилоксимитилоксантин	М	-	-
Галацантиаксантин	О	-	О
19'-Гексаноилокси-галацантиаксантин	М	-	-
Пектенол А	О	О	О
Фукоксантин	М	-	-
19'-Гексаноилокси-фукоксантин	М	-	-
Гетероксантин	О	-	-
Фукоксантинол	М	-	-
19'-Гексаноилокси-фукоксантинол	М	-	-
19'-Гексаноилокси-алленикмитилоксантин	М	-	-
Зеаксантин	-	М	-
Перидинин	М	-	-
Пирроксантинол	М	-	-
Неидентифицированные каротиноиды	0,5 %	-	17 %

Примечание: О – основные, М – минорные, «-» – отсутствующие каротиноиды.

Как следует из таблицы, общими для трех видов моллюсков являлись аллоксантин, диатоксантин и пектенол А. Эти пигменты доминируют у большинства видов двустворок [Britton et al., 1998]. Аллоксантин и диатоксантин относятся к водорослевой группе пигментов [Jeffrey et al., 1997] и поэтому могут быть аккумулированы моллюсками в процессе питания. Имеются сведения, что аллоксантин может образовываться в тканях двустворок и в процессе трансформации фукоксантина [Britton et al., 1998]. Содержание в тканях пектенола А и аллоксантина может также являться результатом метаболической трансформации растительных каротиноидов диатоксантина и фукоксантина соответственно [Britton et al., 1998].

Присутствие в молекуле аллоксантина двух ацетиленовых связей повышает ее реакционную способность, а симметричная структура молекулы обеспечивает равномерное распределение электронной плотности. Такая особенность строения молекулы позволяет участвовать ей в биохимических реакциях в роли акцептора протона. С другой стороны, молекулы диатоксантина и пектенола А не обладают такими свойствами: их структура ассиметрична, присутствует одна ацетиленовая

связь, электронная плотность смещена, а в молекуле пектенола *A* появляется дополнительная (третья) гидроксигруппа. Эти особенности строения дают возможность участвовать им в биохимических реакциях в качестве донора протона. Не исключено, что аллоксантин, диатоксантин и пектенол *A* взаимно дополняют друг друга и принимают участия в регуляции окислительно-восстановительного статуса тканей. Выбор моллюсками этих соединений может быть объяснен, с одной стороны, минимальными затратами на их образование, так как диатоксантин в достаточном количестве находится в пище, а пектенол *A* образуется непосредственно из диатоксантина. С другой стороны, аллоксантин – единственный диацетиленовый каротиноид, характерный для черноморского региона.

Общим для устриц и мидий являлся галацантиаксантин. Данный каротиноид является производным от фукоксантина, который, как отмечалось выше, характерен для диатомовых водорослей [Britton et al., 1998]. Галацантиаксантин образуется из фукоксантинола посредством удаления гидросигруппы [Britton et al., 1998; Matsuno, 2001]. Общность спектра питания и незначительная метаболическая трансформация, по-видимому, и определяют присутствие этого каротиноида в тканях мидий и устриц. Отсутствие его у анадар вероятно связано с тем, что данный моллюск потребляет значительную долю детрита, где доля диатомовых водорослей не велика.

Помимо общих каротиноидов у моллюсков были выявлены и видоспецифичные группы соединений каротиноидного ряда. Устрицы отличались присутствием крассостреаксантина *A* и *B*, у анадар отмечен высокий уровень изомеров пектенолона, а у мидий – митилоксантина и гетероксантина. Ни один из этих каротиноидов не содержится в водорослях и, следовательно, может быть образован только на основе процессов метаболической трансформации, которая, по-видимому, специфична у каждого моллюска.

Крассостреаксантин *A* и *B* может быть получен из галацантиаксантина, который присутствует в тканях устриц в достаточно высокой концентрации [Маока, 2011]. Из этого же соединения может быть образован и митилоксантин, свойственный мидиям [Hertzberg et al., 1988]. Присутствие гетероксантина пока труднообъяснимо. Транс-пектенолон, обнаруженный в тканях анадары, может явиться следствием метаболической трансформации диатоксантина, через пектенол, путем замены гидроксигруппы на оксигруппу.

Состав каротиноидов двустворчатых моллюсков Черного моря и других регионов Мирового океана. Результаты сравнительной оценки представлены в таблице 3.10. Прежде всего, следует обратить внимание на содержание мажорных каротиноидов. В большинстве случаев они совпадают:

- у *M. galloprovincialis* – это аллоксантин, митилоксантин, пектенол *A*, галацантиаксантин, гетероксантин;
- у *C. gigas* – крассостреаксантин *A* и *B*, галацантиаксантин, аллоксантин, пектенол *A*;
- у *A. inaequalvis* – транс-пектенолон, диатоксантин, аллоксантин, пектенол *A*.

Черноморские моллюски отличаются присутствием в тканях значительных количеств диатоксантина. У представителей рода *Mytilus* из других регионов Мирового океана он отсутствует, а у *C. gigas* присутствует лишь в минорных количествах. Исключение составляют моллюски рода *Anadara*. В то же время, в

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

тканях черноморских видов абсолютно отсутствует лютеин, тогда как у моллюсков из других акваторий – это преимущественно мажорный каротиноид. Следует отметить, что диатоксантин и лютеин являются пигментами водорослевого происхождения. Поэтому существующие различия можно объяснить, прежде всего, с позиций качественного состава фитопланктонного сообщества, которое используется фильтраторами как пищевой субстрат. Аналогичным образом можно трактовать и присутствие в тканях тихоокеанских *C. gigas* значительных количеств пиридина.

Таблица 3.10

Качественный состав каротиноидов тканей двустворчатых моллюсков [Matsuno, Maoka, 1981; Goodwin, 1984; Hertzberg et al., 1988; Bjerkgeng et al., 1993; Partali et al., 1989; Maoka et al., 2001; 2005; 2011;]

Каротиноиды	<i>M.g.</i> *	<i>M.e.</i>	<i>C.g.</i> *	<i>C. g.</i>	<i>A. i.</i> *	<i>A. sp.</i>
Астаксантин	-	М	-	-	-	-
β каротин	М	М	-	-	М	М
8'-Апоаллоксантинал	М	-	-	М	-	-
Крассостреаксантин А	М	-	О	О	-	-
Крассостреаксантин В	-	-	О	О	-	-
19'-Гексаноилоксикрассостреаксантин А	М	-	-	-	-	-
Транс-пектенолон	М	-	-	-	О	О
Цис- пектенолон	-	-	-	-	М	-
Диатоксантин	О	-	О	М	О	О
Аллоксантин	О	О	О	О	О	О
Митилоксантин	О	О	-	О	-	М
Изомитилоксантин	-	О	-	-	-	-
Зеаксантин	-	М	-	-	М	-
Лютеин	-	О	-	М	-	О
19'-Гексаноилоксимитилоксантин	М	-	-	-	-	-
19'-Гексаноилоксиалленитилоксантин	М	-	-	-	-	-
Галацинтиаксантин	О	О	О	О	-	-
19'-Гексаноилоксигалацинтиаксантин	М	-	-	-	-	-
Пектенол А	О	О	О	О	О	О
Фукоксантин	М	М	-	М	-	-
19'-Гексаноилоксифукоксантин	М	М	-	-	-	-
Гетероксантин	О	О	-	-	-	-
Фукоксантинол	М	М	-	М	-	-
19'-Гексаноилоксифукоксантинол	М	М	-	-	-	-
Перидинин	М	М	-	О	-	-
Пирроксантинол	М	М	-	М	-	-
Перидининол	-	М	-	М	-	-

Примечание: О – основные, М – минорные, «-» – отсутствующие каротиноиды, * - черноморские моллюски, *M.g.* – *M. galloprovincialis*, *M.e.* – *M. edulis*, *C.g.* – *C. gigas*, *A.i.* – *A. inaequalvis*, *A.sp.* – другие виды рода *Anadara*

Остается неясным отсутствие митилоксантина в тканях черноморских *S. gigas* в сравнении с тихоокеанской группой, тогда как у черноморских *M. galloprovincialis* это мажорный каротиноид. Известно, что митилоксантин является результатом трансформации фукоксантина – основного пигмента диатомовых водорослей. Последние присутствуют преимущественно в донных отложениях и поэтому могут быть недоступны культивируемым в водной толще устрицам, что, по-видимому, и объясняет существующие отличия.

Вероятные пути трансформации растительных каротиноидов в тканях моллюсков-фильтраторов. Согласно опубликованным данным, при потреблении каротиноидов растительного происхождения фильтрующими видами двустворчатых моллюсков, происходит ассимиляция лишь небольшого числа пигментов [Partali, et al., 1989; Liaaen-Jensen, 1998.]. Основная же их часть подвергается метаболической трансформации в тканях животных. Этот процесс имеет видовую специфику и определяется как спектром питания моллюсков, так и функциональной целесообразностью присутствия тех или иных видов каротиноидов в тканях. Последнее особенно важно, так как позволяет осуществлять целенаправленный поиск биологически наиболее значимых видов соединений, относящихся к данной группе.

В настоящем подразделе на основе имеющейся информации, а также собственных данных о составе каротиноидов в тканях ряда фильтрующих видов моллюсков предлагаются вероятные схемы метаболической трансформации этой группы соединений на организменном уровне с учетом трофических межвидовых взаимодействий.

Mytilus galloprovincialis Lam. В 80-х годах прошлого столетия группой норвежских исследователей в теле *M. edulis* было идентифицировано 32 каротиноида [Partali et al., 1989]. Аналогичные исследования были выполнены и на *M. coruscus*. Однако результаты были несколько иными [Maoka, Matsuno, 1988]. Сравнительная оценка качественного состава каротиноидов в телах различных морских организмов приводится и в монографии Т.В. Гудвина, где представлена информация и по *M. galloprovincialis* [Goodwin, 1984]. Показано, что в суммарных экстрактах тканей этого вида преобладает 5 каротиноидов: лютеин, зеаксантин, митилоксантин, 5- и 6-эпокси-лютеины.

Работы вышеуказанных групп исследователей легли в основу представлений об основных путях метаболизма растительных каротиноидов в тканях мидий [Hertzberg et al., 1988; Britton et al., 1998]. Основным направлением принято считать преобразование фукоксантина до митилоксантина и аллоксантина [Britton et al., 1998]. Характерной особенностью представителей рода *Mytilus* было также накопление ацетиленовых каротиноидов, содержащих 3-гидрокси- или 7,8-дидегидро-группы на концах молекул. В качестве основных рассматриваются следующие пути трансформации растительных каротиноидов:

- гидролиз ацетатной группы молекулы каротиноида и превращение фукоксантина в фукоксантинол, а перидинина в перидинол;
- преобразование алленовых каротиноидов в ацетиленовые: фукоксантинола в галоцинтиаксантин, перидининола в пирроксантинол;
- преобразование 5,6-эпоксидной в 5,6-гликольную группу, например, диациноксантина в гетероксантин, пирроксантинола в гидратопирроксантинол.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

При этом аллоксантин рассматривался в качестве единственного диацетиленового каротиноида, который и являлся основным конечным продуктом [Britton et al., 1998].

Фитопланктонное сообщество Черного моря может быть источником для моллюсков-фильтраторов следующих видов каротиноидов: пиридинина, β -каротина, аллоксантина, диатоксантина, фукоксантина, 19'-гексаноилоксифукоксантина. При этом отмечается, что большинство этих каротиноидов образуется в результате трансформации фукоксантина (основного каротиноида диатомовых) [Britton et al., 1998], пиридинина [Britton et al., 1998] и 19'-гексаноилоксифукоксантина [Maoka et al., 2011]. Известно также, что митилоксантин и пектенол А являются основными для *M. galloprovincialis* [Hertzberg et al., 1988].

Согласно собственным данным [Бородина, Солдатов, 2010], в суммарном экстракте тела *M. galloprovincialis* можно выделить 6 основных каротиноидов: митилоксантин (11,5 %), галацантиаксантин (17,6 %), диатоксантин (4,4 %), аллоксантин (4,5 %), гетероксантин (17,2 %) и пектенол А (6,4 %), что составляет более 60 %. Остальные 14 указанных выше каротиноидов не являются постоянными и зависят от сезонной динамики состава фитопланктонных сообществ, либо являются тканеспецифичными.

На основе полученных нами результатов и известных представлений о путях трансформации растительных каротиноидов в тканях двустворчатых моллюсков, ниже представлена обобщенная схема трансформации каротиноидов в тканях *M. galloprovincialis* на основе 3-х растительных пигментов: фукоксантина, диатоксантина и пиридинина (рис. 3.26). Отличительной чертой «потока» каротиноидов через это трофическое звено является образование в молекулах каротиноидов дополнительных гидрокси- и оксо-групп (митилоксантин, пектенол А), а также появление дополнительной ацетиленовой связи (аллоксантин).

На рисунке 3.27 метаболизм от фукоксантина до аллоксантина (8'-апоаллоксантинала) обозначен буквой А, от диатоксантина до пектенолона – Б, а от пиридинина до пирроксантинола – В. Эти три пути метаболической трансформации были составлены на основе информации [Hertzberg et al., 1988; Britton et al., 1998] и соответствуют нашим результатам по качественному составу каротиноидов в тканях *M. galloprovincialis*.

Подробная идентификация каротиноидов суммарного экстракта *M. galloprovincialis*, проведенная в настоящей работе, позволила обнаружить 3 новых соединения, относящихся к группе 19'-гексаноилокаротиноидов: 19'-гексаноилоксигалоцантиаксантин, 19'-гексаноилоксикрассостреаксантин А, 19'-гексаноилоксимитилоксантин. На образование и накопление последних могло оказать влияние «цветение» *Emiliana huxleyi* в Севастопольской бухте [Стельмах, 2009]. Это позволило определить новые пути трансформации каротиноидов данной группы в теле *M. galloprovincialis*. Метаболическая схема этих процессов представлена ниже (рис. 3.28) [Maoka et al., 2011].

Crassostrea gigas Th. В тканях тихоокеанской устрицы *C. gigas* японскими исследователями было идентифицировано 25 каротиноидов [Maoka et al., 2001; 2005; Maoka, 2011]. Большинство из них содержалось в минимальном или следовом количестве.

Глава 3

Сравнительная оценка показала, что каротиноидный состав тканей черноморских интродуцентов *C. gigas* имел определенные отличия. У тихоокеанских моллюсков в тканях доминировали галоцинтиаксантин, митилоксантин, аллоксантин, красостреаксантин А и В. Содержание других было существенно ниже [Маока et al., 2001; 2005]. У черноморских моллюсков помимо аллоксантина (25±4 %), красостреаксантина А (15±5 %), красостреаксантина В (10±3 %) и галоцинтиаксантина (10±3 %) в тканях обнаруживались в значительных количествах пектенол А (8±1 %) и диатоксантин (5±1 %). Доля митилоксантина была невелика.

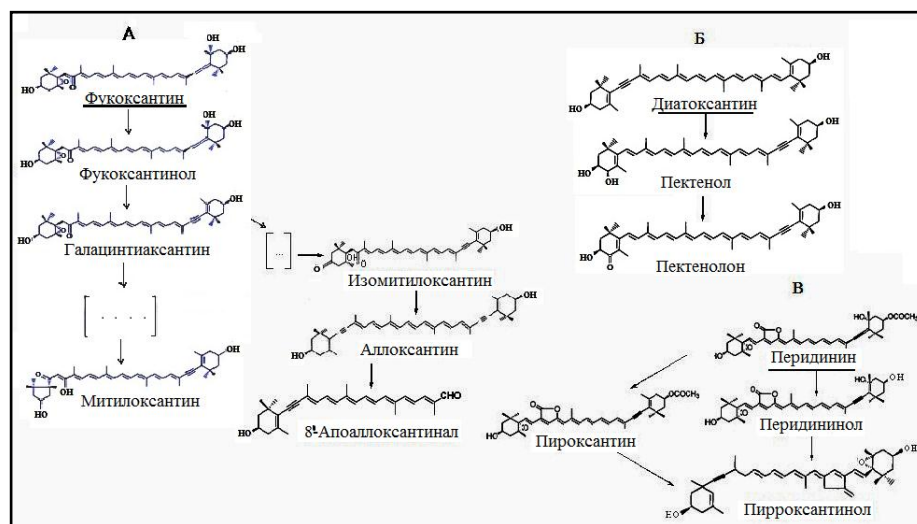


Рис. 3.27. Схема трансформации каротиноидов в трофической цепи «фитопланктон- мидии» (растительные пигменты подчеркнуты; А, Б, В – три направления трансформации)

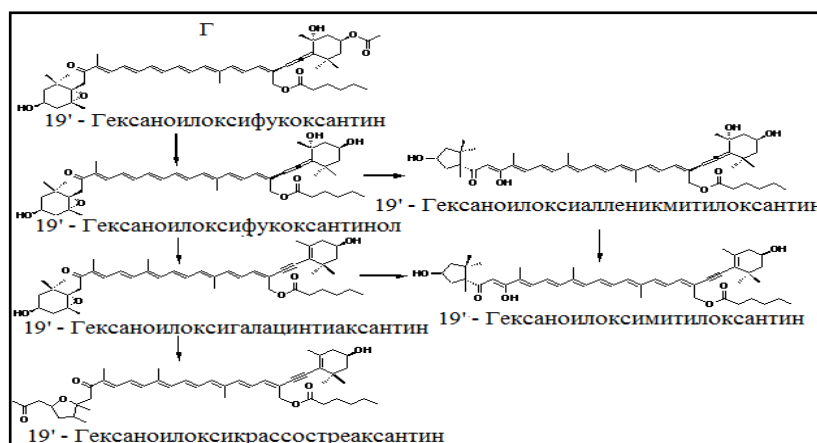


Рис. 3.28. Схема трансформации 19'-гексаноилокаротиноидов в теле мидий

Опираясь на результаты собственных исследований [Бородина, 2009], а также учитывая известные пути трансформации каротиноидов в тканях *C. gigas* и других двустворчатых моллюсков, известные из опубликованных работ [Маока et

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

al., 2001; 2005; Маока, 2011], ниже предлагается схема метаболических путей, обеспечивающих формирование спектра каротиноидов у черноморских интродуцентов *C. gigas* (рис. 3.29).

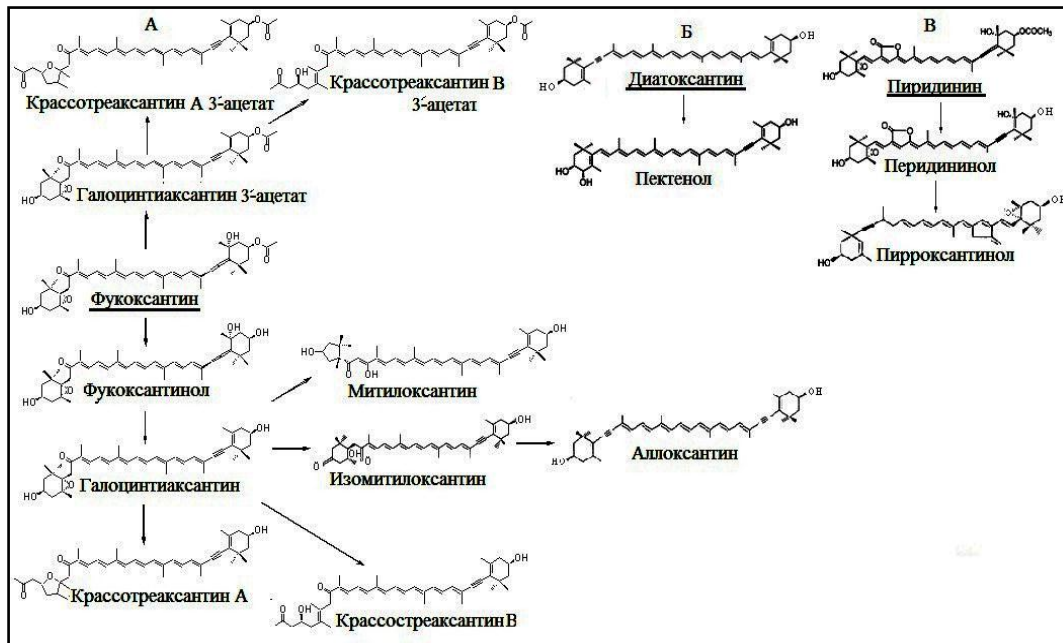


Рис. 3.29. Схема трансформации каротиноидов в трофической цепи «фитопланктон-устрицы» (растительные пигменты подчеркнуты; А, Б, В – три направления трансформации)

Накопление в теле устриц таких каротиноидов, как аллоксантин, диатоксантин, галоцинтиаксантин и пектенол А аналогично другому двустворчатому моллюску фильтратору – мидии [Маока, 2011]. Этот процесс связан с метаболической трансформацией фукоксантина до аллоксантина [Hertzberg et al., 1988; Britton et al., 1998] и диатоксантина до пектенола А [Britton et al., 1998]. Присутствие в тканях устриц аллоксантина в значительных концентрациях, а также наличие галоцинтиаксантина, позволяет предполагать наличие у черноморских устриц сходного с мидиями пути метаболизма от фукоксантина до аллоксантина и от диатоксантина до пектенола А [Britton et al., 1998; Маока, 2011]. Однако устрицы имеют видоспецифичные каротиноиды: красостреаксантин А и В, которые, так же как и аллоксантин, являются производными фукоксантина и относятся к конечным продуктам метаболизма этого растительного пигмента. Их образование связано с разрушением одного из циклогексановых колец и формированием ацетатной, оксо- и гидроксигрупп на концах молекул.

В целом накопление синтезируемых *C. gigas* каротиноидов, как и у *M. galloprovincialis*, имеет приоритет перед каротиноидами водорослевого происхождения. Содержание растительных пигментов (фукоксантина и диатоксантина) в тканях этого моллюска было минимальным.

Anadara inaequalvis Br. Известно, что все представители рода *Anadara* имеют очень ограниченный набор каротиноидов: от 5 до 6 основных видов пигментов и нескольких их эфиров [Matsuno, Maoka, 1981; Ha et al., 1989]. Ни более ранние исследования тихоокеанских видов рода *Anadara*, ни наши исследования черноморской *A. inaequalvis* не показали присутствие в составе тканей моллюска митилоксантина, красностреаксантина А и В, которые специфичны соответственно для черноморских мидий и устриц.

К отличительным особенностям *A. inaequalvis* можно также отнести преимущественное накопление в тканях конечного продукта метаболизма фукоксантина – аллоксантина, а также высокое содержание продукта трансформации диатоксантина – пектенолона (около 20 % от суммы всех пигментов), причем в его более активной транс-изомерной форме (более 80 % от общего пектенолона). При этом в организме анадары не отслеживаются многие промежуточные каротиноиды этого метаболического пути, которые были свойственны другим двустворчатым моллюскам-фильтраторам. Следует обратить внимание также на высокое содержание сложных эфиров аллоксантина и диатоксантина (около 40 %) и сосуществование диатоксантина с его более восстановленными формами, такими как пектенол и пектенолон. Причины последнего до конца не понятны.

Учитывая имеющуюся информацию [Matsuno, Maoka, 1981; Ha et al., 1989, Бородина и др., 2009] и собственные результаты, можно предположить, что основной метаболизм у анадары происходит от тех же растительных каротиноидов, что у мидий и устриц: фукоксантин → аллоксантин (рис. 3.27, 3.29); диатоксантин → пектенол → пектенолон (рис. 3.30).

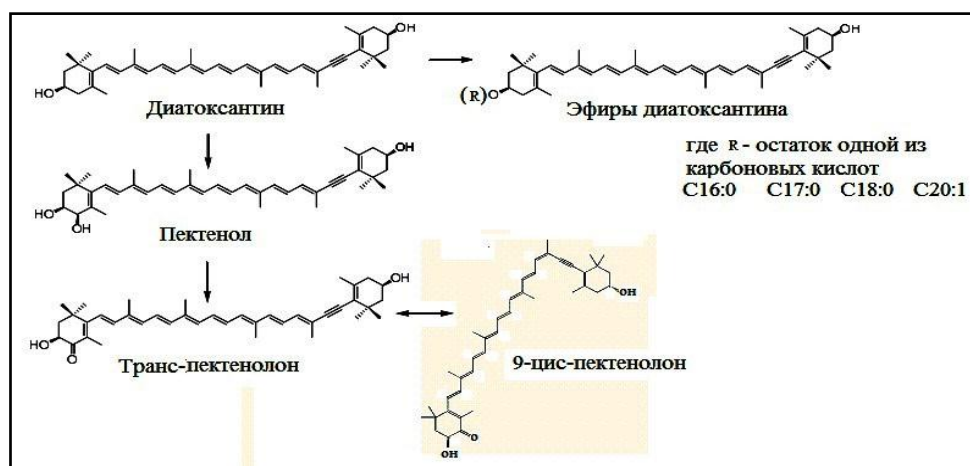


Рис. 3.30. Схема трансформации диатоксантина в тканях *A. inaequalvis*

С точки зрения преобразований в молекулах пигментов, у анадар повышается концентрация каротиноидов с диацетиленовыми связями (аллоксантина), помимо этого увеличивается уровень каротиноидов с содержанием гидрокси- и оксо – групп в молекулах. Также как у мидий и устриц, происходит преимущественное накопление каротиноидов животного происхождения (пектенол, пектенолон, аллоксантин и эфиры каротиноидов), а не растительных (β -каротин, зеаксантин, диатоксантин).

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Таким образом, среди основной группы каротиноидов общими для черноморских двустворчатых моллюсков являются аллоксантин, диатоксантин и пектенол А. Первые два относятся к водорослевой группе пигментов, что позволяет говорить об общности их спектра питания. В основе метаболических путей трансформации соединений каротиноидного ряда, по-видимому, лежат два процесса: преобразование фукоксантина и диатоксантина. Они определяют как общность, так и специфичность спектра каротиноидов тканей исследованных видов двустворок.

3.3. Каротиноиды тканей различных цветковых морф *M. galloprovincialis*

Природа цветкового полиморфизма окраски раковин *M. galloprovincialis* обсуждается уже на протяжении более чем 25-ти лет. В этой связи часто используется понятие «цветовая морфа», отражающее окраску конхиолинового слоя створок. Различают две основные морфы – с черной и коричневой окраской раковины, а также ряд промежуточных форм, населяющих различные биотопы (скальные и донные) [Зайка и др., 1990; Иванов, 2007; Холодов и др., 2010]. Считается, что этот признак генетически детерминирован и является маркером комплекса генов, контролирующего ряд физиологических и биохимических процессов в организме моллюска. Показано, что между ними существуют различия в скорости образования и прочности биссусных нитей [Вехова, 2007], темпах соматического роста тканей [Щербань, 2000], состоянии антиоксидантного ферментного комплекса [Солдатов и др., 2003]. Однако окончательной ясности в этом вопросе нет.

Результаты гибридологического анализа изучения изоферментного спектра эстераз Est-2 и 6-фосфоглюконатдегидрогеназ позволяют говорить о простой однолокусной двухаллельной схеме наследования признака, где коричневый цвет является доминантным [Столбова и др., 1996]. Однако в работах, выполненных на *M. edulis*, высказывается иная точка зрения, о том, что наследование идет по пути кодоминирования [Шурова, Золотарев, 2008]. Некоторые авторы вообще считают, что окраска раковины является модификацией и связана со световым режимом акватории [Казанкова, 2010].

Сравнительный анализ содержания каротиноидов в тканях различных цветковых морф мидий обнаружил, что у особей со слабой пигментацией конхиолинового слоя раковин и депигментированными тканевыми структурами содержание данной группы пигментов было в 11-33 раза ниже [Солдатов и др., 2003]. Это негативно влияло на состояние антиоксидантного ферментного комплекса тканей у данной группы моллюсков [Солдатов и др., 2003], что побудило нас сопоставить качественный состав каротиноидов у *M. galloprovincialis* с различной пигментацией створок: черной, коричневой и светло-коричневой окраской.

3.3.1. Содержание каротиноидов в тканях трех цветковых морф мидий

Максимальное содержание каротиноидов у всех цветковых морф было отмечено в гепатопанкреасе – 14-18 мг 100 г⁻¹ сырого веса. Оно в 8-10 раз

превышало величины, зарегистрированные для ноги и жабр моллюсков ($p < 0,001$) (рис. 3.31). В этих тканях уровень каротиноидов был близким и составлял 1-2 мг 100 г^{-1} сырого веса. Статистически значимых различий между цветовыми морфами моллюска обнаружено не было. При этом у особей с черной окраской раковины содержание каротиноидов во всех исследованных тканях было повышенным [Бородина, Солдатов, 2010].

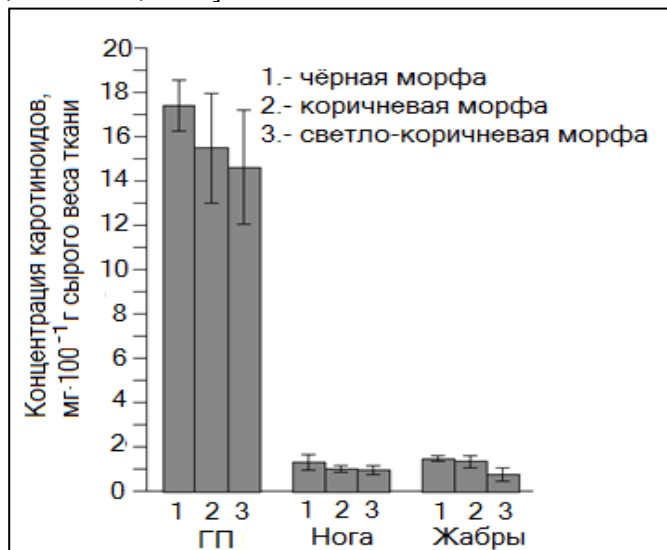


Рис. 3.31. Концентрация суммарных каротиноидов в гепатопанкреасе (ГП), ноге, жабрах у 3 цветовых морф *Mytilus galloprovincialis*

Следует отметить, что абсолютные значения содержания каротиноидов, представленные в настоящей работе, совпадали с величинами, полученными другими авторами [Поспелова, 2008].

3.3.2. Качественный состав каротиноидов тканей трех цветовых морф мидий

После проведения качественной идентификации каротиноидов в суммарных экстрактах тканей *M. galloprovincialis* с применением HPLC, FAB MS, $^1\text{H-NMR}$ удалось соотнести эти результаты с ТСХ (подраздел 3.2). Поэтому сравнительная оценка качественного состава каротиноидов тканей мидий различных цветовых морф была проведена исключительно с применением ТСХ.

Применение ТСХ, спектрального анализа и качественных реакций на химические группы позволило идентифицировать в основном мажорные виды каротиноидов. Минорная группа обозначена как «неидентифицированные каротиноиды». Примеры ТСХ представлены на рисунке 3.32.

В таблице 3.11 также показаны максимумы поглощения в UV-VIS диапазоне для выделенных каротиноидов и их смещение при проведении качественных реакций на наличие гидрокси- (реакция ацилирования), оксо- (реакция с NaBH_4) групп и двойной сопряженной связи (реакция с I_2).

При проведении реакции с 20 % HCl в этаноле, изменения окраски у каждого из исследованных каротиноидов не наблюдались, это подтвердило отсутствие эпокси-группы в составе их молекул.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

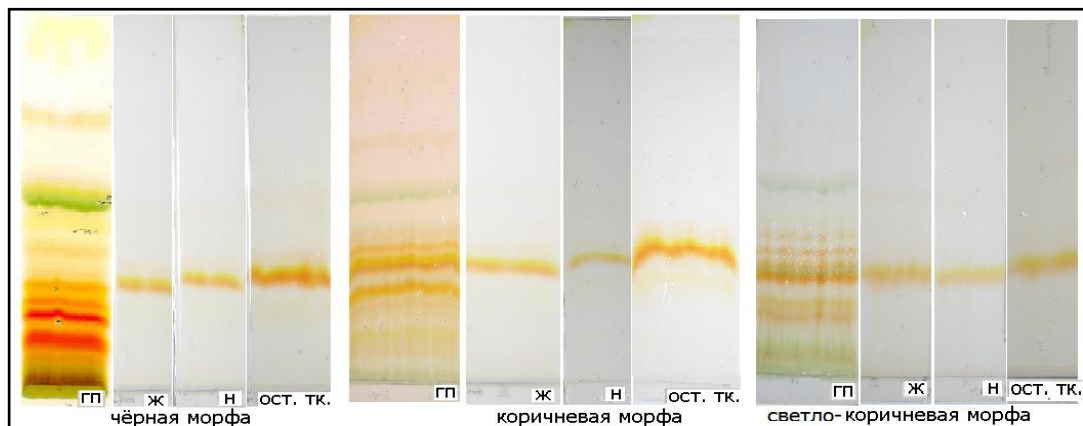


Рис. 3.32. ТСХ тканей трех цветовых морф *Mytilus galloprovincialis* (ГП – гепатопанкреас, Ж – жабры, Н – нога, ост. тк. – остальные ткани)

Таблица 3.11

Спектральные характеристики каротиноидов *Mytilus galloprovincialis* до и после качественных реакций на наличие гидроксид- и оксо- групп и двойной сопряженной связи

Название каротиноида	Реакция с J ₂ (в гексане)	Реакция с NaBH ₄ (в метаноле)	Реакция ацилирования
Пектенолон	До реакции λ _{макс} : 461-464; После реакции λ _{макс} : 444; 472.	До реакции λ _{макс} : 461-464; После реакции λ _{макс} : 452; 480.	-
Аллоксантин + Диатоксантин	До реакции λ _{макс} : (425); 453; 480; После реакции λ _{макс} : (417); 441; 470,5	До реакции λ _{макс} : (425); 453; 480; После реакции λ _{макс} не изменились	Снижение подвижности пигментов на ТСХ после проведения реакции
Митилоксантин	-	До реакции λ _{макс} : 469; После реакции λ _{макс} : 428; 458.	Снижение подвижности пигмента на ТСХ после проведения реакции
Пектенол А	До реакции λ _{макс} : 425; 451,5; 479,9; После реакции λ _{макс} : 417; 443,5; 471.	-	Снижение подвижности пигмента на ТСХ после проведения реакции

Максимальное число пигментных полос выявлялось в гепатопанкреасе (около 15). В остальных тканях их было не более 5-6. Качественных отличий в составе каротиноидов между цветовыми морфами обнаружено не было. С помощью ТСХ удалось идентифицировать и определить содержание 6-ти мажорных каротиноидов: β-каротина, пектенолона, митилоксантана, пектенола А и комплекса «аллоксантин – диатоксантин». Их процентное соотношение в тканях мидий различных цветовых морф представлено в таблице 3.12.

Таблица 3.12

Качественный состав каротиноидов тканей различных цветовых морф *Mytilus galloprovincialis*

Орган	Содержание каротиноидов, %					
	β -каротин	Пектенолон	Аллоксантин + диатоксантин	Митилоксантин	Пектенол А	НИ
<i>Черная морфа</i>						
Нога	8,0 \pm 3,1	21,0 \pm 5,2	17,7 \pm 2,0	22,2 \pm 5,6	7,8 \pm 2,8	\approx 24
ГП	2,7 \pm 0,9	9,3 \pm 0,4	8,4 \pm 0,7	11,9 \pm 1,4	7,6 \pm 0,4	\approx 60
Жабры	-	10,5 \pm 4,3	28,0 \pm 2,7	19,7 \pm 1,9	15,3 \pm 2,8	\approx 27
<i>Коричневая морфа</i>						
Нога	1 \pm 1	16,5 \pm 6,2	30,3 \pm 3,5	33,0 \pm 2,2	11,5 \pm 2,2	\approx 3
ГП	4,2 \pm 0,6	10,9 \pm 2,7	14,6 \pm 1,7	9,9 \pm 3,6	10,5 \pm 0,5	\approx 50
Жабры	-	9,0 \pm 3,9	37,1 \pm 4,4	17,3 \pm 1,8	25,7 \pm 4,5	\approx 11
<i>Светло-коричневая морфа</i>						
Нога	3,3 \pm 3,3	-	35,8 \pm 4,0	26,5 \pm 3,2	31,7 \pm 0,6	-
ГП	4,5 \pm 0,4	11,1 \pm 0,6	18,6 \pm 1,2	17,1 \pm 1,3	14,3 \pm 0,5	\approx 34
Жабры	-	16,6 \pm 3,1	38,6 \pm 6,1	18,0 \pm 3,8	22,0 \pm 6,0	\approx 4

Примечание: НИ – неидентифицированные каротиноиды

Черная морфа имела наиболее богатый спектр каротиноидов. Об этом свидетельствует число неидентифицированных пигментов в тканях (24-60 %). В ноге и жабрах преобладали пектенолон, митилоксантин и компоненты алло-диатоксантинового комплекса. В жабрах также отмечался достаточно высокий уровень пектенола А. В гепатопанкреасе картина была несколько иной. Здесь явно доминировал митилоксантин.

Содержание же остальных каротиноидов (пектенолон, пектенол А, компоненты алло-диатоксантинового комплекса) находилось на уровне 7,0-9,5 %. Доля β -каротина была минимальна – 2,7 \pm 0,9.

Сходным образом распределялись каротиноиды в тканях двух других морф. Однако были и существенные отличия. По мере осветления раковины моллюска, наблюдалось снижение числа неидентифицированных пигментов. Особенно это было заметно в ноге и жабрах обеих морф. При этом доля митилоксантина, пектенола А и компонентов алло-диатоксантинового комплекса соответственно повышалась. В сравнении с черной морфой различия в большинстве случаев были статистически выражены.

У светло-коричневой морфы число неидентифицированных каротиноидов было минимально (4-34 %). В ноге они не выявлялись совсем. В тканях преобладал комплекс «аллоксантин-диатоксантин» и пектенол А.

Как отмечалось (подраздел 3.2), состав каротиноидов суммарных экстрактов тканей *M. galloprovincialis* исследован наиболее полно. Всего

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

идентифицировано 20 каротиноидов, что составляет 99 % от общего содержания. Сопоставление настоящих результатов с представленными в подразделе 3.2 позволяет говорить о том, что метод ТСХ не дает возможности выявить все виды мажорных и минорных каротиноидов. В группу неидентифицированных попадают 14 пигментов каротиноидного ряда:

- 7 мажорных каротиноидов: крассотреаксантин, фукоксантин, фукоксантинол, галацантиаксантин, гетероксантин, 19'-гексаноилоксигалацантиаксантин, 19'-гексаноилоксифукоксантинол;
- 7 минорных каротиноидов: 8'-апоаллоксантинол, пирроксантинол, 19'-гексаноилоксиалленикмитилоксантин, 19'-гексаноилоксимитилоксантин, 19'-гексаноилоксикрассотреаксантин А, 19'-гексаноилоксифукоксантин, перидинин.

Из результатов, представленных в настоящем разделе, следует, что цветовые морфы *M. galloprovincialis* не отличаются по суммарному уровню каротиноидов в тканях. Качественный состав пигментов по данным ТСХ также оказывается близким. В тканях преобладают пектенол А, пектенолон, аллоксантин, диатоксантин, митилоксантин и β -каротин. Единственное отличие – доля неидентифицированных пигментов. Она сокращалась по мере осветления раковины моллюска. За этим фактом может стоять несколько следствий.

- Мажорная и минорная группы неидентифицированных пигментов могут иметь качественные отличия в тканях различных цветовых морф *M. galloprovincialis*, что допускает наличие специфики в аккумуляции и метаболической трансформации каротиноидов.
- При отсутствии межморфных отличий в качественном составе каротиноидов можно говорить о разных скоростях метаболизма данной группы соединений. У мидий со светло-коричневыми створками раковины эти характеристики должны быть снижены. Следствием этого может быть уменьшение доли минорных соединений, которые чаще всего являются промежуточными метаболитами.

Подобная трактовка полученных результатов имеет под собой и гидробиологическую составляющую. Известно, что моллюски с черной окраской раковины тяготеют к скальным биотопам [Заика и др., 1990; Иванов, 2007], где высокий уровень кислорода и повышенное содержание микроводорослей – первичный источник каротиноидов. Представители коричневой и светло-коричневой морф, напротив, образуют преимущественно донные скопления, где биомасса и разнообразие фитопланктонного сообщества существенно уступают поверхностным слоям водной толщи. Полученные в настоящем разделе результаты позволяют сделать ряд обобщений.

- Основным органом, накапливающим каротиноиды, у всех цветовых морф *M. galloprovincialis* являлся гепатопанкреас. Содержание их в других органах (жабры, нога) было в 8-10 раз ниже. Количественных отличий в суммарном уровне каротиноидов в тканях трех цветовых морф обнаружено не было.
- При помощи ТСХ, спектров в видимой области и качественных химических реакций в экстрактах тканей 3-х цветовых морф *M. galloprovincialis* удалось идентифицировать 6 мажорных каротиноидов: β -каротин, пектенолон, аллоксантин, диатоксантин, митилоксантин и пектенол А. Качественных

отличий в составе каротиноидов тканей у моллюсков с различной пигментацией раковин не обнаружено.

- По мере осветления раковины моллюска упрощается каротиноидный состав тканей. Число неидентифицированных каротиноидов при помощи метода ТСХ существенно понижается. Одновременно повышается относительное содержание в тканях пектенола А и компонентов алло-диатоксантинового комплекса.

3.4. Сезонная динамика содержания и состава каротиноидов в тканях *A. inaequalvis*

Основным источником каротиноидов для двустворчатых моллюсков-фильтраторов являются различные фракции бактерио-, фито- и зоопланктона, которые они получают в процессе питания. Известно, что биомасса и видовое разнообразие планктонного сообщества не является постоянным и претерпевает существенные изменения на протяжении годового цикла [Сеничева, 2008; Брянцева, 2008]. Это позволяет предположить, что содержание и качественный состав каротиноидов в тканях двустворок может коррелировать с этим процессом. Проверке данного положения и посвящены настоящие исследования. В качестве объекта был выбран двустворчатый моллюск *Anadara inaequalvis*. Наблюдения выполнялись на протяжении февраля-июня 2007 года. Анализу подвергали ногу, жабры, гепатопанкреас и остаточные ткани моллюска.

3.4.1. Содержание и состав каротиноидов тканей *A. inaequalvis*

Нога моллюска. Динамика изменения состава и содержания каротиноидов в ткани ноги моллюска представлена на рисунке 3.33. Как видно, уровень суммарных каротиноидов в данном органе понижался с февраля по апрель. Снижение составило около 50 % относительно уровня, зарегистрированного в феврале ($p < 0,001$). С апреля по май процесс приобретал противоположную направленность. К концу мая рост суммарных каротиноидов в ноге *A. inaequalvis* достигал 75 % ($p < 0,01$) от исходного.

Аналогичную динамику имели β -каротин, транс- и цис-пектенолоны, алло-, диато- и зеаксантины, эфиры каротиноидов. Исключение составил пектенол А: с февраля по начало мая отмечали тенденцию роста содержания данного пигмента, а затем существенное понижение. Следует отметить значительную вариабельность значений данного показателя. То же можно сказать и относительно цис-пектенолона. Поэтому в ряде случаев различия не были статистически выражены, а носили характер тенденции.

Качественный состав каротиноидов в ноге моллюска при этом не претерпевал существенных изменений (табл. 3.13).

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Доли цис-пектенолона, алло- и диатоксантина, эфиров каротиноидов сохранялись на протяжении всего периода наблюдений. Имеющиеся различия не были статистически выражены. В то же время относительное содержание β -каротина, транс-пектенолона и зеаксантина в весенние месяцы (апрель-май) было ниже ($p < 0,05$), чем зимой.

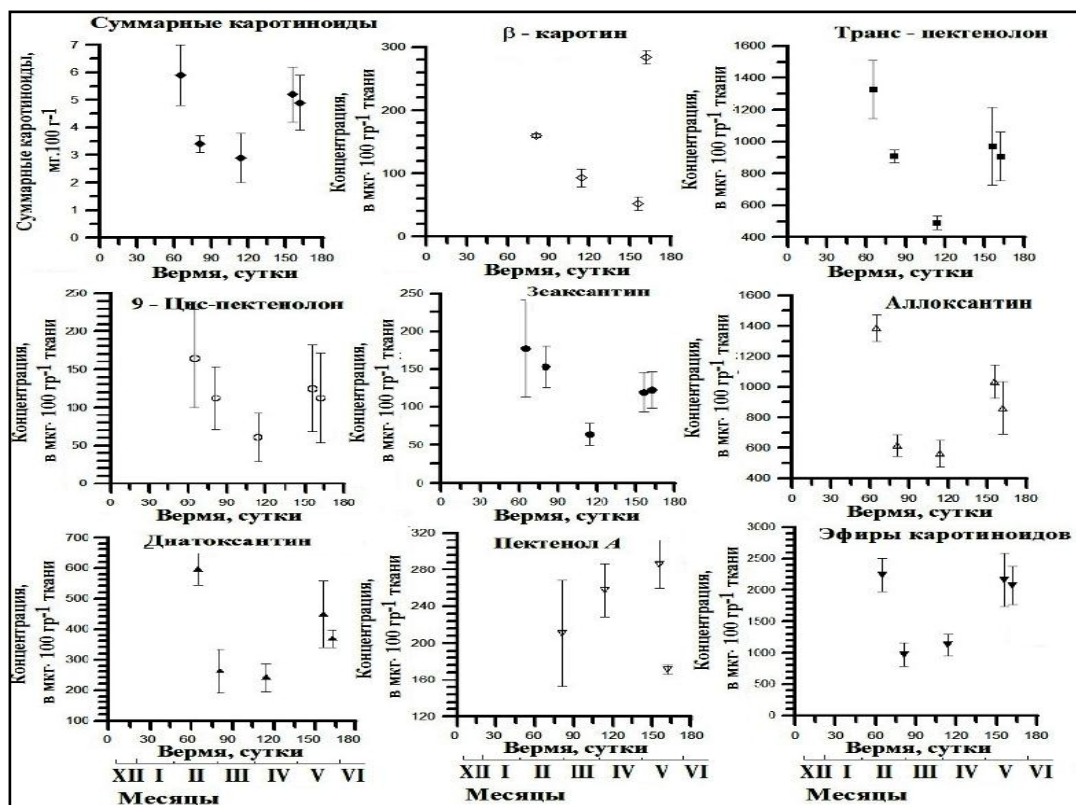


Рис. 3.33. Динамика изменения содержания и состава каротиноидов в ноге *Anadara inaequalvis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Таблица 3.13

Изменение процентного соотношения каротиноидов в ноге *Anadara inaequalvis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Каротиноиды	Соотношение каротиноидов в ткани, %				
	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
β -каротин	-	4,7 \pm 0,1	3,2 \pm 0,5	1,0 \pm 0,2	5,8 \pm 2,1
Транс-пектенолон	22,5 \pm 3,1	26,7 \pm 1,2	16,9 \pm 1,5	18,7 \pm 4,7	18,5 \pm 3,1
Цис-пектенолон	2,8 \pm 1,1	3,3 \pm 1,2	2,1 \pm 1,1	2,4 \pm 1,1	2,3 \pm 1,2
Зеаксантин	3,0 \pm 1,1	4,5 \pm 0,8	2,2 \pm 0,5	2,3 \pm 0,5	2,5 \pm 0,5
Аллоксантин	23,5 \pm 1,5	18,1 \pm 2,1	19,4 \pm 3,0	19,9 \pm 2,1	17,6 \pm 3,5
Диатоксантин	10,1 \pm 0,9	7,7 \pm 2,1	8,3 \pm 1,6	8,6 \pm 2,1	7,5 \pm 0,6
Пектенол А	-	6,2 \pm 1,7	8,9 \pm 1,0	5,5 \pm 0,5	3,5 \pm 0,1
Эфиры каротиноидов	38,0 \pm 4,5	28,7 \pm 5,5	38,8 \pm 6,0	41,6 \pm 8,2	42,3 \pm 6,2

Это означает, что вклад данной группы пигментов в динамику изменения суммарных каротиноидов в ноге моллюска был выше. Следует также отметить снижение уровня пектенола А к концу мая ($p < 0,05$).

Гепатопанкреас моллюска. Динамика изменения содержания каротиноидов в гепатопанкреасе *A. inaequalvis* совпадала с отмеченной выше. В течение февраля-апреля происходило снижение близкое к 50 % ($p < 0,01$), а затем – рост более чем в 2 раза (рис. 3.34). При этом в мае-июне уровень каротиноидов в данном органе превысил значения, зарегистрированные в феврале. Сходную динамику имели транс- и цис-пектенолоны, алло- и диатоксантины, зеаксантин и эфиры каротиноидов.

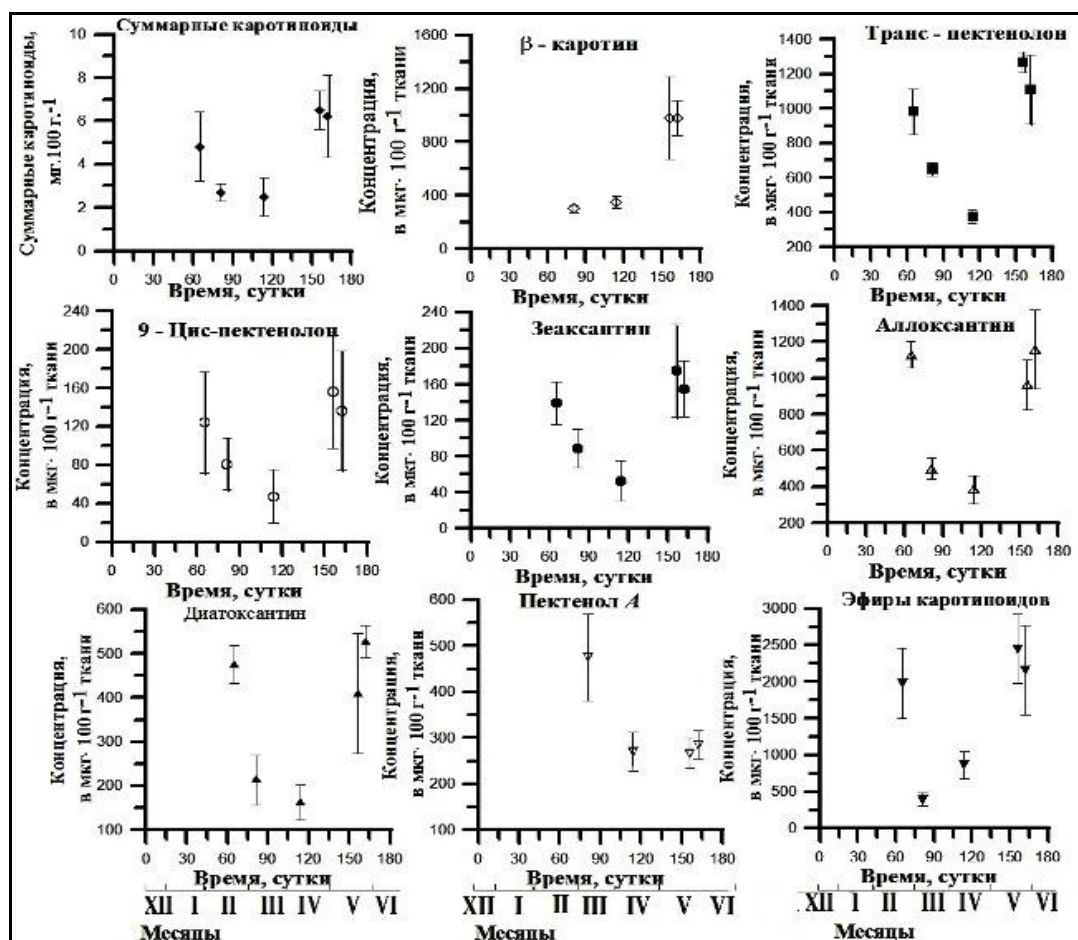


Рис.3.34. Динамика изменения содержания и состава каротиноидов в гепатопанкреасе *Anadara inaequalvis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Изменение содержания β -каротина и пектенола А на протяжении февраля-июня имело ряд особенностей (рис. 3.33). Уровень β -каротина в марте был минимален – около $300 \text{ мкг } 100 \text{ г}^{-1} \text{ ткани}$. К маю-июню он существенно повышался – до $1000 \text{ мкг } 100 \text{ г}^{-1} \text{ ткани}$ ($p < 0,001$). Динамика изменения содержания пектенола А в гепатопанкреасе была противоположной. В марте уровень данного каротиноида

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

был максимальным – около 500 мкг 100 г⁻¹ ткани, а в мае-июне минимальным (250-300 мкг 100 г⁻¹ ткани). Различия составили 60-100 % ($p < 0,001$).

Оценка качественного состава каротиноидов гепатопанкреаса представлена в таблице 3.14.

Таблица 3.14

Изменение процентного соотношения каротиноидов в гепатопанкреасе *Anadara inaequalis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Каротиноиды	Соотношение каротиноидов в ткани, %				
	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
β-каротин	-	11,1 ± 1,0	13,9 ± 1,9	15,1 ± 4,8	15,8 ± 2,1
Транс-пектенолон	20,5 ± 2,8	24,1 ± 1,4	15,1 ± 1,5	19,5 ± 0,8	17,9 ± 3,2
Цис-пектенолон	2,6 ± 1,1	3,0 ± 1,0	1,9 ± 1,1	2,4 ± 0,9	2,2 ± 1,0
Зеаксантин	2,9 ± 0,5	3,3 ± 0,8	2,1 ± 0,9	2,7 ± 0,8	2,5 ± 0,5
Аллоксантин	23,0 ± 1,7	18,5 ± 3,1	15,2 ± 2,8	14,8 ± 1,3	18,7 ± 3,8
Диатоксантин	9,9 ± 1,0	7,9 ± 1,0	6,5 ± 1,6	6,3 ± 1,1	8,5 ± 0,5
Пектенол А	-	17,6 ± 3,5	10,8 ± 1,7	4,1 ± 0,3	4,6 ± 0,5
Эфиры каротиноидов	41,2 ± 10,0	14,5 ± 3,4	34,5 ± 7,4	37,7 ± 7,3	34,8 ± 9,9

Как видно, в ткани явно доминировали транс-пектенолон и аллоксантин. В феврале на них приходилось более 20 % состава. В апреле уровень этих пигментов становился менее значительным – 15,0-15,5 % ($p < 0,01$). Однако к июню был близок к 20 %. В сравнении с февралем различия не были статистически выражены. Сходную динамику имел и уровень эфиров каротиноидов в гепатопанкреасе. Изменения происходили в более широком диапазоне 14-42 %. Минимум приходился на апрель. В последующие месяцы доля этой группы соединений полностью восстанавливалась.

Жабры моллюска. Характер изменения содержания суммарных каротиноидов в жабрах моллюска на протяжении февраля-июня совпадал с рассмотренными выше для ноги и гепатопанкреаса (рис. 3.35).

В течение февраля-апреля происходило снижение значений, затем (апрель-июнь) существенный рост. Величина снижения также была близка к 50 % ($p < 0,01$), а в июне значения несколько превышали февральский уровень, хотя различия не были статистически достоверны. Аналогичным образом изменялось содержание в жабрах транс- и цис-пектенолона, алло- и диатоксантина, зеаксантина и эфиров каротиноидов. В большей степени это затрагивало фракции транс-пектенолона, аллоксантина и эфиров каротиноидов.

Динамика β-каротина и пектенола А была иной. С февраля по март β-каротин в жабрах не обнаруживался. В мае он появлялся в незначительных количествах – 20 мкг 100 г⁻¹ ткани, а в июне его уровень достигал 160 мкг 100 г⁻¹ ткани, что в 8 раз выше ($p < 0,001$). Схожие изменения претерпевало и содержание пектенола А. В феврале он не регистрировался. В течение марта-апреля его уровень составлял 200-250 мкг 100 г⁻¹ ткани. В июне же наблюдали максимальные значения – около 600 мкг 100 г⁻¹ ткани. Различия были статистически достоверны ($p < 0,001$). Оценка качественного состава показала, что доля мажорных пигментов (транс-пектенолон, аллоксантин) и эфиров каротиноидов в жабрах моллюска в марте-апреле понижалась, а к июню восстанавливалась практически до исходного уровня (табл. 3.15).

Исключение составил транс-пектенолон, доля которого в июне была на 30 % ниже ($p < 0,01$), чем феврале. Относительное содержание цис-пектенолона, зеаксантина и диатоксантина практически не изменялось. Имеющиеся различия в силу значительной вариабельности значений не были статистически значимы (табл. 3.15).

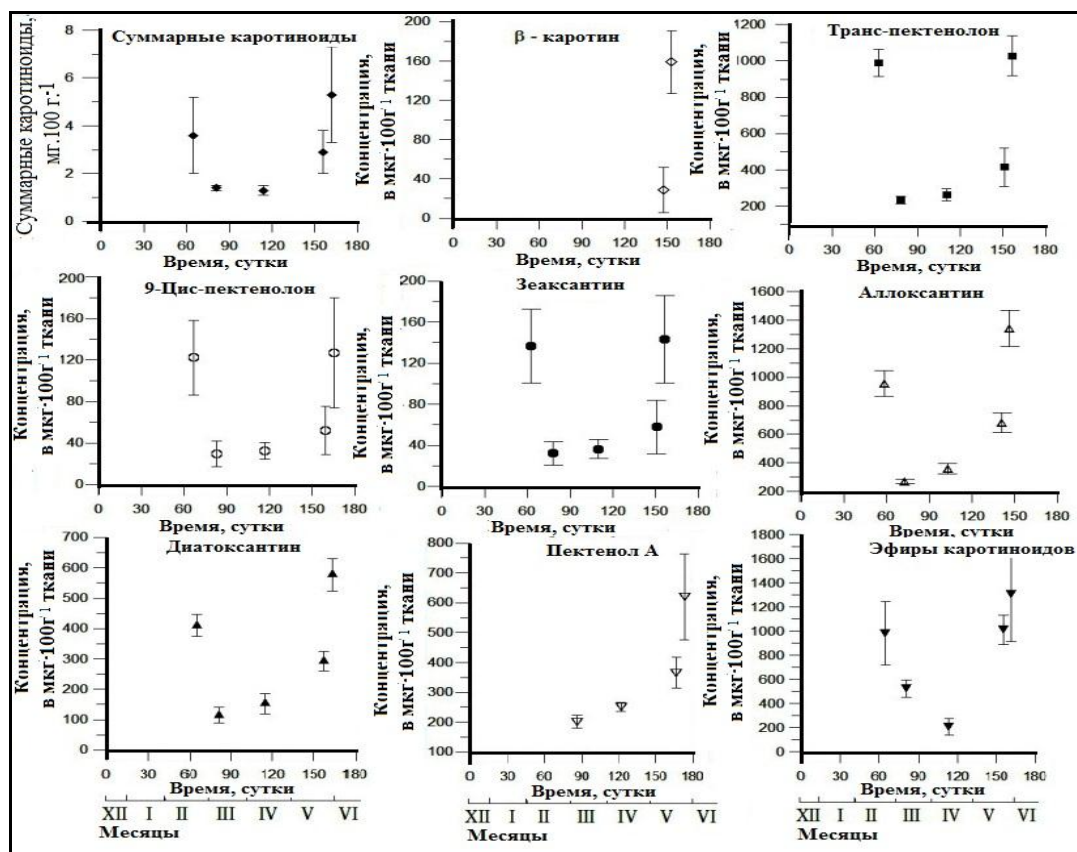


Рис. 3.35. Динамика изменения содержания и состава каротиноидов в жабрах *Anadara inaequalvis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Таблица 3.15

Изменение процентного соотношения каротиноидов в жабрах *Anadara inaequalvis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Каротиноиды	Соотношение каротиноидов в ткани, %				
	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
β-каротин	-	-	-	1,0 ± 0,8	3,0 ± 0,6
Транс-пектенолон	27,5 ± 2,1	16,6 ± 1,5	20,2 ± 2,5	14,3 ± 3,7	19,4 ± 2,1
Цис-пектенолон	3,4 ± 1,0	2,1 ± 0,9	2,5 ± 0,6	1,8 ± 0,8	2,4 ± 1,0
Зеаксантин	3,8 ± 1,0	2,3 ± 0,8	2,8 ± 0,7	2,0 ± 0,9	2,7 ± 0,8
Аллоксантин	26,6 ± 2,5	19,2 ± 1,1	27,5 ± 2,9	23,5 ± 2,4	25,3 ± 2,4
Диатоксантин	11,4 ± 1,0	8,2 ± 1,9	11,8 ± 2,6	10,1 ± 1,1	10,9 ± 1,0
Пектенол А	-	14,4 ± 1,5	19,3 ± 1,2	12,6 ± 1,8	11,7 ± 2,7
Эфиры каротиноидов	27,3 ± 7,3	37,3 ± 5,0	15,8 ± 5,2	34,8 ± 4,3	24,6 ± 7,4

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Как и в случае с гепатопанкреасом, доля пектенола А в течение февраля-июня постепенно сокращалась (табл. 3.15). В сравнении с апрелем относительный уровень этого каротиноида понижался с $19,3 \pm 1,2$ до $11,7 \pm 2,7$ %. Различия составили почти 40 % ($p < 0,01$). При этом доля β -каротина существенно увеличивалась: от нуля до $3,0 \pm 0,6$ %.

Остаточные ткани моллюска. Динамика уровня каротиноидов в остаточных тканях *A. inaequalvis* совпадала с рассмотренной ранее (рис. 3.36). Суммарный уровень этих соединений в течение февраля-апреля понижался почти на 80 % ($p < 0,001$), но к июню полностью восстанавливался.

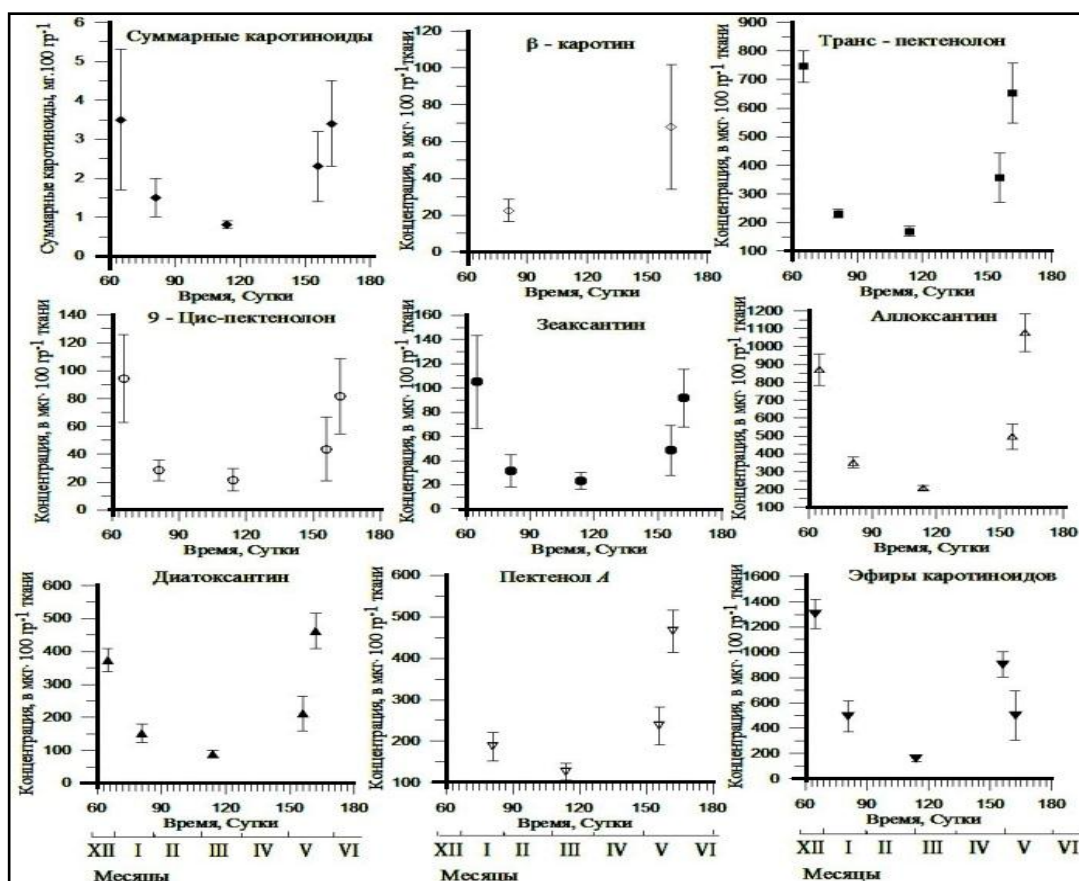


Рис. 3.36. Динамика изменения содержания и состава каротиноидов в остаточных тканях *Anadara inaequalvis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Как и в случае с другими тканями, такая динамика наблюдалась у транс- и цис-пектенолона, зеа-, алло- и диатоксантинов, эфиров каротиноидов. Единственная особенность заключалась в том, что содержание эфиров каротиноидов в остаточных тканях моллюска в июне была на 30 % ($p < 0,001$) ниже, чем в феврале. Говорить о сезонной динамике β -каротина сложно, так как этот каротиноид в большинстве случаев не регистрировался.

Изменение содержания пектенола А в целом совпадало с динамикой суммарных каротиноидов. Однако здесь скорее можно говорить о росте содержания данного пигмента, а не о восстановлении его исходного уровня.

Относительно процентного соотношения каротиноидов в остаточных тканях *A. inaequalvis* можно констатировать, что доля цис-пектенолона, зеа- и диатоксантина, пектенола А в течение февраля-июня не изменялась (табл. 3.16). Различия не были статистически выражены.

Таблица 3.16

Изменение процентного соотношения каротиноидов в остаточных тканях *Anadara inaequalvis* на протяжении февраля-июня 2007 года

Каротиноиды	Соотношение каротиноидов в ткани, %				
	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
β-каротин	-	1,5 ± 0,4	-	-	2,0 ± 1,0
Транс-пектенолон	21,3 ± 1,6	15,4 ± 1,0	21,2 ± 2,2	15,5 ± 3,7	19,2 ± 3,1
Цис-пектенолон	2,7 ± 0,9	1,9 ± 0,5	2,7 ± 1,0	1,9 ± 1,0	2,4 ± 0,8
Зеаксантин	3,0 ± 1,1	2,1 ± 0,9	2,9 ± 0,9	2,1 ± 0,9	2,7 ± 0,7
Аллоксантин	24,9 ± 2,5	23,4 ± 2,0	26,1 ± 1,6	21,6 ± 3,1	31,7 ± 3,5
Диатоксантин	10,7 ± 1,0	10,1 ± 1,9	11,2 ± 1,2	9,2 ± 2,3	13,6 ± 1,6
Пектенол А	-	12,5 ± 2,3	15,8 ± 1,2	10,3 ± 2,0	13,7 ± 1,5
Эфиры каротиноидов	37,3 ± 3,3	33,0 ± 8,0	20,0 ± 2,9	39,3 ± 4,3	14,7 ± 5,7

Динамика транс-пектенолона, аллоксантина и эфиров каротиноидов была сложной. В сравнении с февралем в июне доля транс-пектенолона оставалась неизменной, уровень аллоксантина повышался, а эфиров каротиноидов падал. Относительно значений, зарегистрированных в мае, различия были достоверны (аллоксантин – $p < 0,01$; эфиры каротиноидов – $p < 0,001$).

3.4.2. Оценка корреляционных связей

Из представленных в подразделе 3.4.1 результатов следует, что сезонная динамика содержания суммарных каротиноидов и их отдельных фракций у *A. inaequalvis* практически не имела тканевой специфики. В течение февраля-апреля значения большинства контролируемых показателей понижались, а затем (апрель-июнь) наблюдался их рост. При этом отмечались незначительные изменения качественных отношений пигментов в тканях.

Для того, чтобы выявить группу пигментов, вносящих наибольший вклад в динамику изменения содержания суммарных каротиноидов, необходимо учитывать две величины:

- относительное содержание той или иной фракции;
- величину коэффициента детерминации R^2 содержания каротиноида по отношению к их суммарному количеству.

Первая величина представлена в таблицах 3.13-16, а вторая предлагается к обсуждению в настоящем подразделе.

Нога моллюска. Прежде всего, следует обратить внимание на мажорную группу каротиноидов, содержание которых близко или превышает 20 %: транс-пектенолон, аллоксантин, эфиры каротиноидов (табл. 3.13). Как видно, величины

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

R^2 для них были выше 0,75 (рис. 3.37). Особенно велика корреляция суммарных каротиноидов с уровнем аллоксантина ($R^2 = 0,964$). Достаточно высокие значения R^2 получены и в отношении цис-пектенолона и диатоксантина: 0,747 и 0,962 соответственно. Однако их доля в ткани ноги моллюска была невелика (2-10 %) и соответственно участие в изменении содержания суммарных каротиноидов было ниже. В отношении остальных пигментов (β -каротин, зеаксантин, пектенол А) значимой связи не установлено.

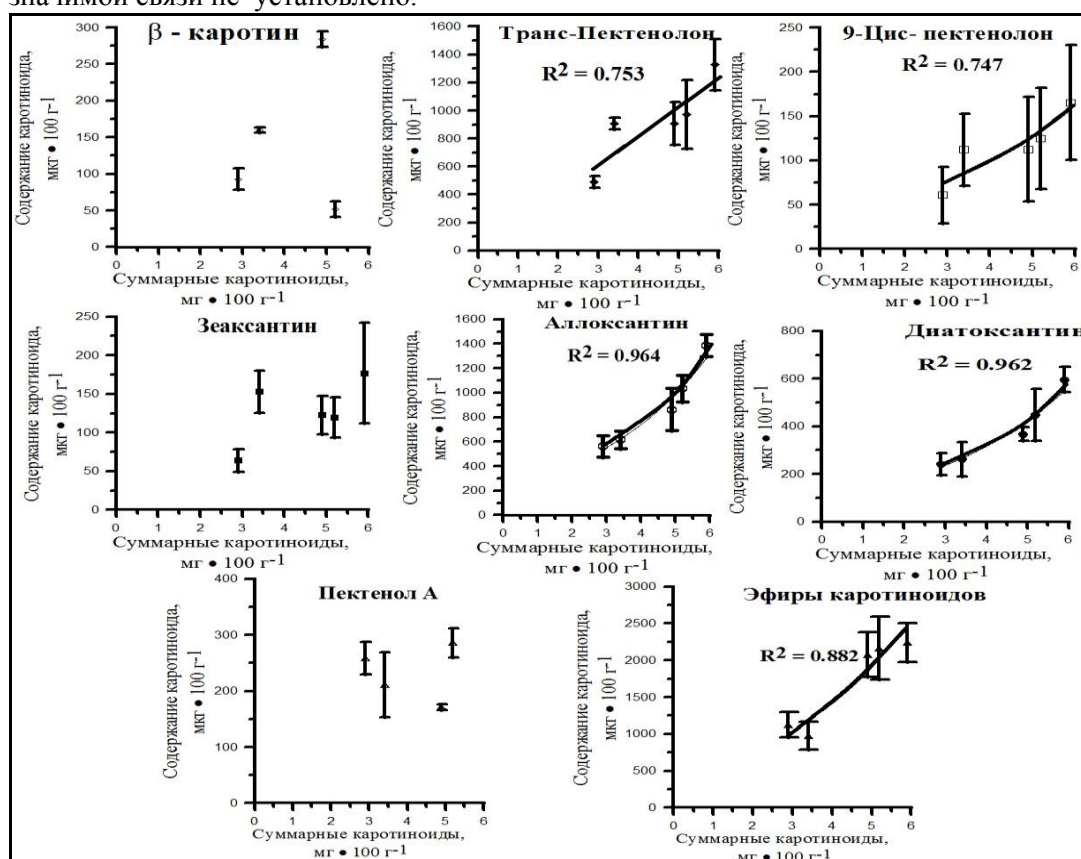


Рис. 3.37. Корреляционные отношения в системе «суммарные каротиноиды – отдельные виды каротиноидов» для ноги *Anadara inaequalis*

Гепатопанкреас моллюска. Содержание суммарных каротиноидов в гепатопанкреасе *A. inaequalis* коррелировало практически со всеми идентифицированными пигментами кроме пектенола А (рис. 3.38). Особенно высокие значения отмечены в отношении транс- и цис-пектенолона, β -каротина, зеаксантина и эфиров каротиноидов (R^2 более 0,9). Для алло- и диатоксантинов значения R^2 были несколько ниже (0,75-0,80).

Следует принять во внимание то, что к мажорной группе пигментов гепатопанкреаса относятся, прежде всего, транс-пектенолон, β -каротин, аллоксантин, эфиры каротиноидов и отчасти диатоксантин (табл. 3.14). Поэтому роль их в сезонной динамике суммарных каротиноидов, по-видимому, является ведущей.

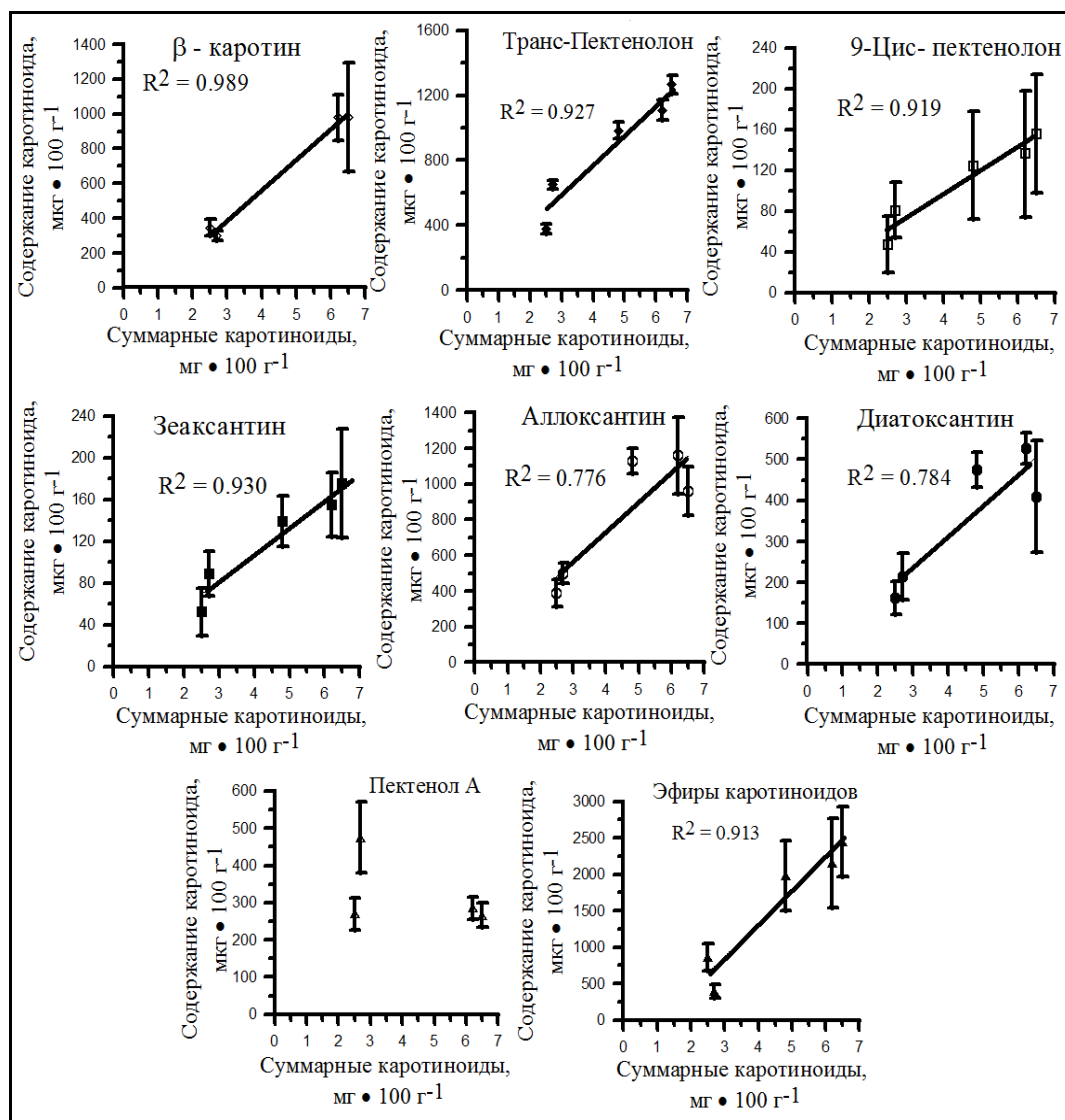


Рис. 3.38. Корреляционные отношения в системе «суммарные каротиноиды – отдельные виды каротиноидов» для гепатопанкреаса *Anadara inaequalvis*

Жабры моллюска. Результаты, полученные для данного органа, практически совпадают с представленными для гепатопанкреаса (рис. 3.39). Корреляционные связи в системе «суммарные каротиноиды – отдельные виды каротиноидов» установлены фактически в отношении всех пигментов. R^2 не рассчитывался только для β -каротина, так как этот каротиноид содержался в жабрах в минорных количествах и не всегда выявлялся опытным путем. Мажорная группа была представлена транс-пектенолоном, алло- и диатоксантином, пектенолом А и эфирами каротиноидов (табл. 3.15). Это позволяет рассматривать ее в качестве основной, определяющей сезонную динамику суммарных каротиноидов в жаберной ткани.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

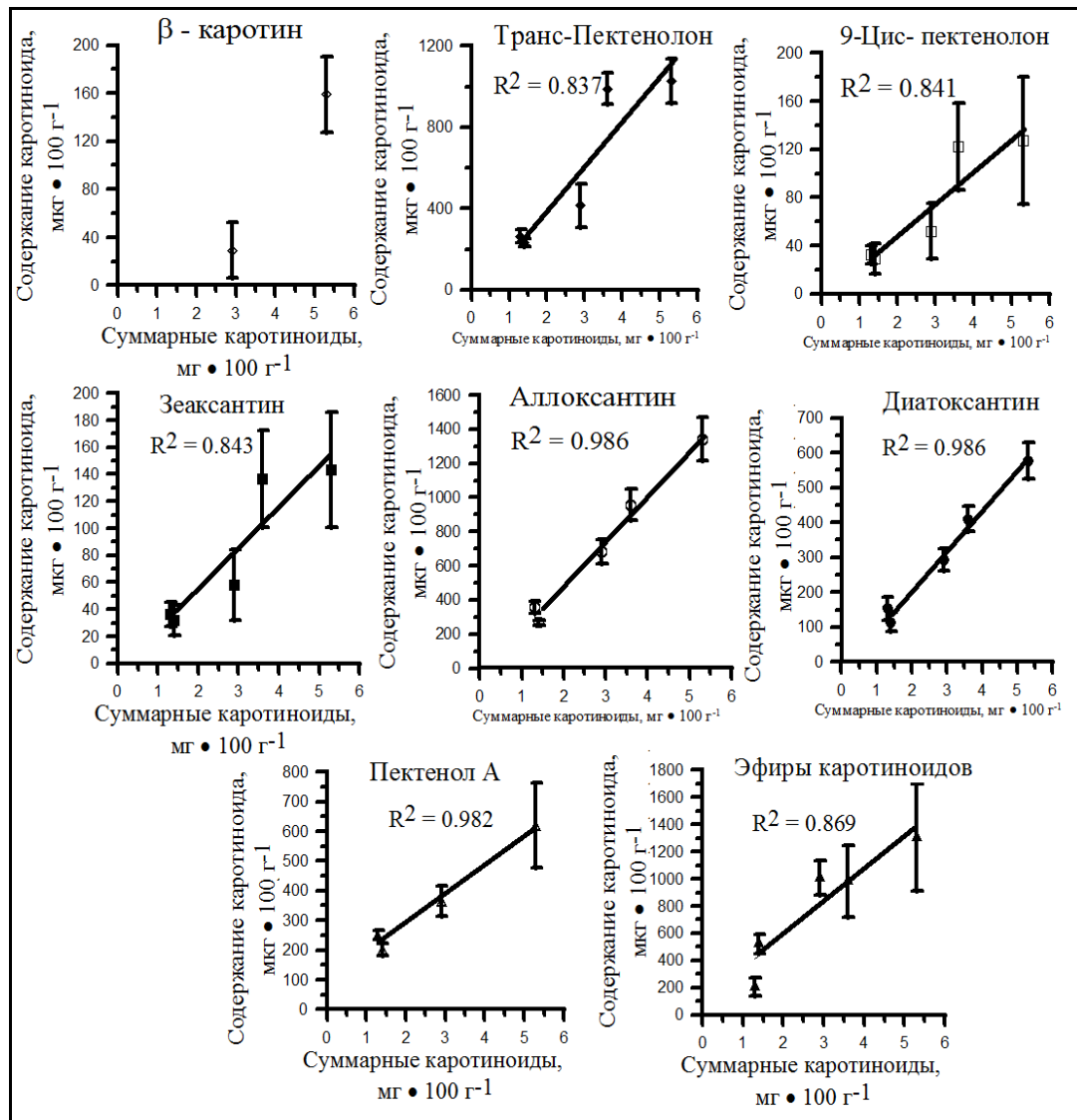


Рис. 3.39. Корреляционные отношения в системе «суммарные каротиноиды – отдельные виды каротиноидов» для жабр *A. inaequalvis*

Остаточные ткани моллюска. Результаты анализа корреляционных связей для данной группы тканей представлены на рисунке 3.40. Для всех пигментов, кроме β -каротина и эфиров каротиноидов, установлены высокие значения R^2 – более 0,9. Мажорная группа пигментов, также как и в отношении ноги, гепатопанкреаса и жабр, была представлена транс-пектенолоном, алло- и диатоксантином, пектенолом А и эфирами каротиноидов (табл. 3.16). Несмотря на относительно слабую корреляцию содержания суммарных каротиноидов с их эфирами, участие этой группы пигментов может также играть существенную роль в сезонной динамике, так как на них приходится от 15 до 38 % состава.

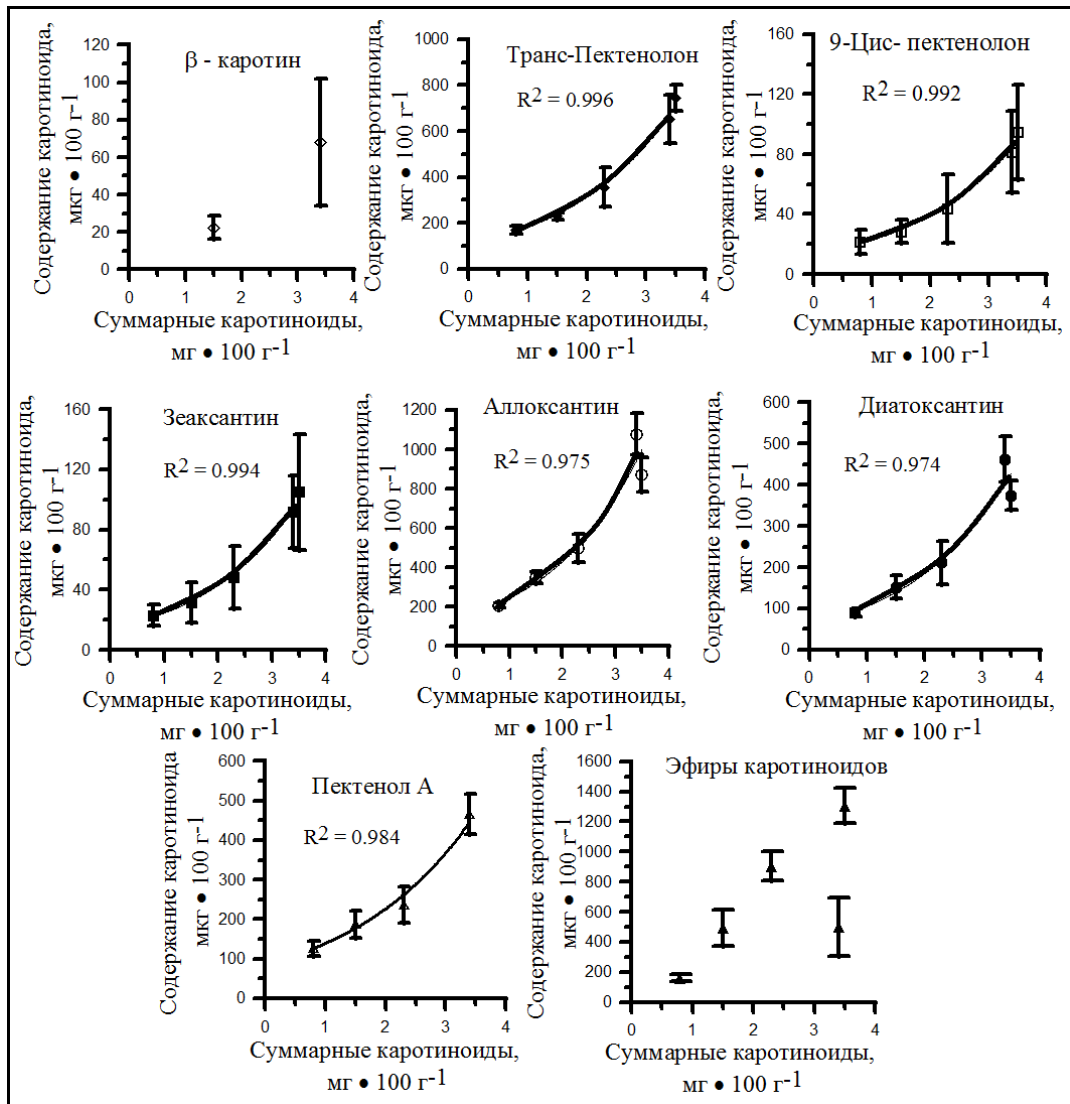


Рис. 3.40. Корреляционные отношения в системе «суммарные каротиноиды – отдельные виды каротиноидов» для остаточных тканей *A. inaequalvis*

К пигментам мажорной группы у *A. inaequalvis* относятся в основном транс-пектенолон, аллоксантин и эфиры каротиноидов. Они явно преобладают во всех исследованных тканях моллюска. В ряде органов отмечено сравнительно высокая доля диатоксантина, пектенола А (жабры, остаточные ткани) и β -каротина (гепатопанкреас). Анализ механизмов изменения содержания в тканях мажорной группы пигментов позволит определить и причины, стоящие за их сезонной динамикой.

Как уже отмечалось (подраздел 3.2), диатоксантин относится к растительным пигментам. Его аккумуляция тканями моллюска и дальнейшая метаболическая трансформация позволяют получать пектенол А, транс- и цис-пектенолоны и их эфиры. Накопление же аллоксантина в тканях является результатом метаболизма другого растительного пигмента – фукоксантина (рис.

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

3.29-30). Отсюда следует, что сезонная динамика содержания суммарных каротиноидов и их отдельных фракций в тканях *A. inaequalvis*, скорее всего, отражает изменение в биомассе и видовом разнообразии фитопланктона.

Как известно, доминирующей фракцией фитопланктона являются диатомовые водоросли [Сеничева, 2008]. Они же содержат в значительном количестве фуко- и диатоксантины [Чурилова и др., 2008]. Для диатомовых характерны две стадии сукцессии [Брянцева, 2008]:

- развитие мелкоклеточных водорослей (первая стадия);
- развитие крупноклеточных водорослей (вторая стадия).

Первая приходится на весенне-летний период, а вторая – на осенне-зимний. Это хорошо объясняет высокий уровень каротиноидов в тканях *A. inaequalvis* в феврале и июне и низкий в апреле. В этом, по-видимому, и следует усматривать основную причину сезонной динамики содержания каротиноидов и их фракций у *A. inaequalvis*.

Таким образом, в течение февраля-июня наблюдали моноцикличность в изменении содержания каротиноидов в тканях *A. inaequalvis*: максимумы – в феврале и июне, минимум – в апреле. Процесс не имел тканевой специфики. Он был связан с изменением содержания мажорной группы пигментов: транс-пектенолона, аллоксантина и эфиров каротиноидов. Об этом свидетельствовали высокие значения R^2 . В основе отмеченной динамики, по-видимому, лежит динамика сукцессии диатомовых водорослей в течение годового цикла.

3.5. Каротиноиды тканей брюхоногого моллюска *Rapana venosa* Val.

Rapana venosa Val. – хищный брюхоногий моллюск, естественный ареал которого ограничен бассейном Японского моря. В Черное море попал в начале 40-х годов прошлого столетия [Чухчин, 1984; Гаевская, 2006]. В настоящее время имеет широкое распространение по всему побережью Черного моря и южной части Азовского моря [Гаевская, 2006]. Является типично эврибионтным видом. Практически не имеет естественных конкурентов, являясь терминальным звеном в трофических цепях донных сообществ [Гаевская, 2006]. В этой связи представляет интерес в изучении процессов метаболической трансформации каротиноидов, так как является основным потребителем черноморских двустворок.

3.5.1. Содержание и состав каротиноидов тканей *R. venosa*

Содержание каротиноидов в тканях самцов и самок *R. venosa* не совпадало. У самцов оно было существенно выше: самцы – $8,54 \pm 0,5$ мг·100⁻¹ г сырого веса, самки – $6,28 \pm 0,3$ мг·100⁻¹ г сырого веса. Различия составляли 36 % ($p < 0,001$).

Анализ средневзвешенного распределения каротиноидов в тканях *R. venosa* показал, что основная доля их приходилась на гонады моллюсков обоих полов 61-65 % (рис. 3.41). Уровень каротиноидов в ноге моллюска был незначительным (3-9 % от суммы каротиноидов), несмотря на сравнительно большой вес этого органа. Основную окраску оставшимся тканям придавала пищеварительная железа – гепатопанкреас, однако содержание каротиноидов в ней было почти в 2 раза ниже, чем в гонадах.

Идентификация каротиноидов при помощи ТСХ, UV-VIS спектров и качественных реакций. Состав каротиноидов суммарных экстрактов тканей *R. venosa* сначала был исследован при помощи метода ТСХ. На рисунке 3.42 представлены фотографии ТСХ у самцов (А) и самок (Б) *R. venosa* в системе ацетон: гептан (3:7).

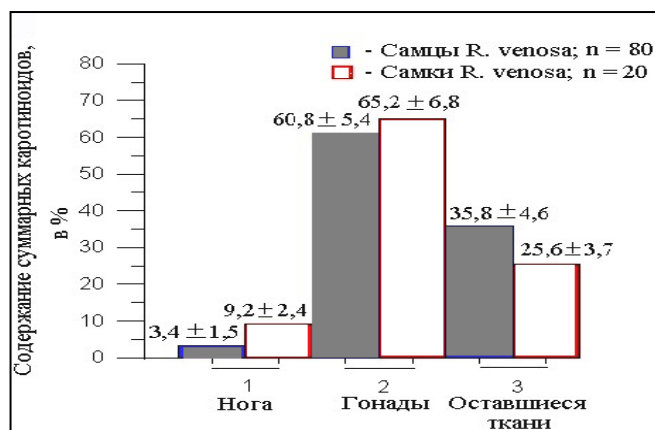


Рис. 3.41. Средневзвешенное распределение содержания каротиноидов в тканях *Rana venosa*

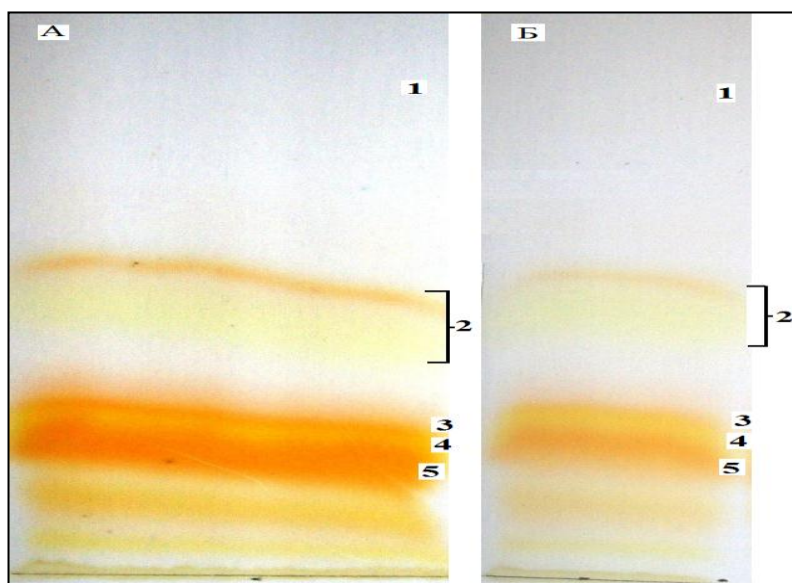


Рис. 3.42. ТСХ суммарных экстрактов тканей самцов (А) и самок (Б) *Rana venosa*

Визуальная оценка позволяет констатировать, что количество фракций, их подвижность (R_f) и окраска идентичны у обеих групп особей. На хроматограммах обозначены фракции со следующими характеристиками R_f и цвета:

- 1 – желтый пигмент с R_f – 0,88;
- 2 – розовый и желтый пигменты с R_f – 0,53 – 0,48;
- 3 – розовый пигмент R_f – 0,35

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

- 4 – желтый двоянный пигмент с $R_f = 0,33$;
- 5 – красный пигмент с $R_f = 0,31$.

После элюирования растворы фракций подвергли спектральному анализу (табл. 3.17). Полученные максимумы поглощения и величины R_f для фракций 1 и 3-5 были сопоставлены с известными для каротиноидов, идентифицированных у других видов моллюсков [Francis et al., 1970; Portali et al., 1985; Naugan et al., 1994; Tewari et al., 2001;].

Таблица 3.17

Показатели R_f и максимумы UV-VIS спектров выделенных каротиноидов

Наименование	R_f	$\lambda_{\text{макс}}$ (в ацетоне), нм
β -каротин	0,88	426; 453; 480;
Пектенолон	0,40	460-464
Аллоксантин + Диатоксантин	0,36	424; 452; 480;
Митилоксантин	0,32	469

Это позволило предположить, что в них присутствуют: 1 – β -каротин, 3 – пектенолон, 4 – смесь диатоксантина и аллоксантина, 5 – митилоксантин. Вторую фракцию дополнительно подвергли омылению и по изменению подвижности (R_f) и спектра видимой области предположили наличие в ней сложных эфиров каротиноидов.

С выделенными фракциями каротиноидов были проведены качественные реакции на наличие сопряженной двойной связи и кето-группы (с J_2 и $NaBH_4$). Результаты этой работы представлены на рисунке 3.43. Как видно, введение этих соединений в растворы каротиноидов вызывало характерное изменение их спектров. Это подтверждает присутствие соответствующих связей и групп в молекулах пигментов.

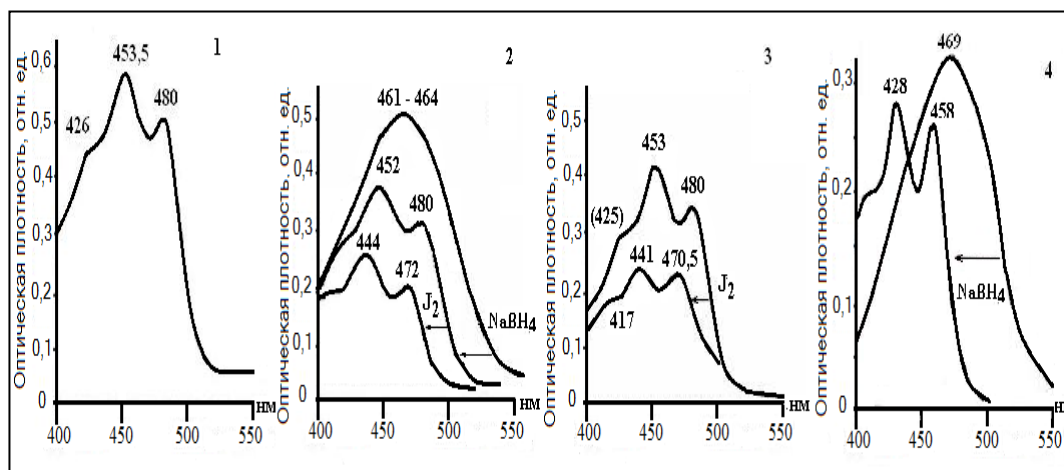


Рис. 3.43. Спектры видимой области 4 каротиноидов *Rapana venosa*: 1 – β -каротина (в ацетоне); 2 – пектенолона (в метаноле, реакция с $NaBH_4$, в гексане с J_2); 3 – смесь аллоксантина и диатоксантина (в гексане); 4 – митилоксантин (в метаноле)

Несмотря на то, что по основным характеристикам фракции хроматограмм самцов и самок были близки (рис. 3.44), спектры видимой области этих экстрактов (в ацетоне и хлороформе) имели отличия, что допускает несовпадение качественного состава каротиноидов.

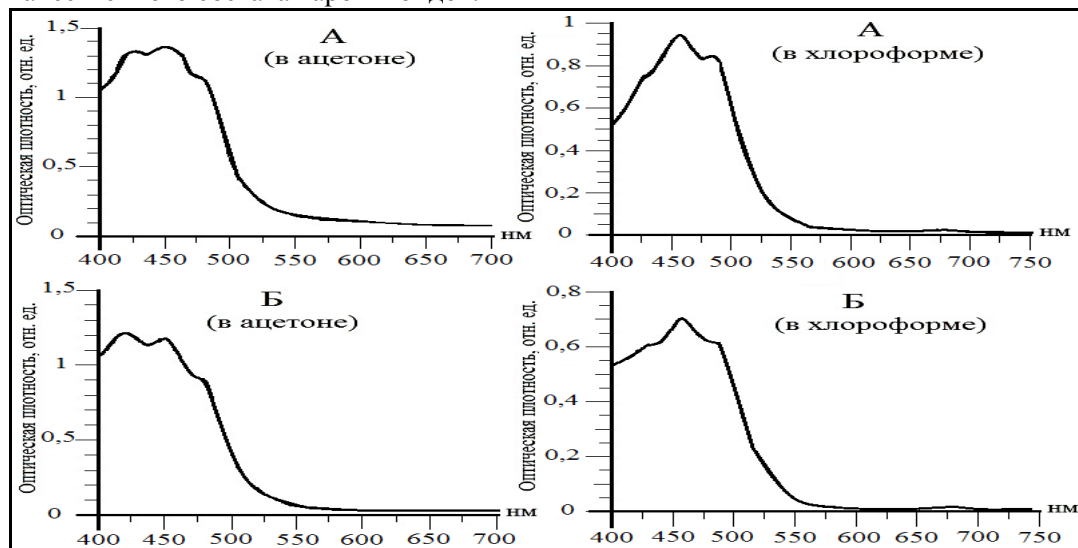


Рис. 3.44. Спектр в видимой области ацетоновых и хлороформенных экстрактов суммарных каротиноидов самцов (А) и самок (Б) *Rana venosa*

Идентификация каротиноидов при помощи HPLC и FAB MS. HPLC в системе ацетон : гексан (2:8) экстрактов суммарных каротиноидов самцов и самок *R. venosa* представлены на рисунке 3.45.

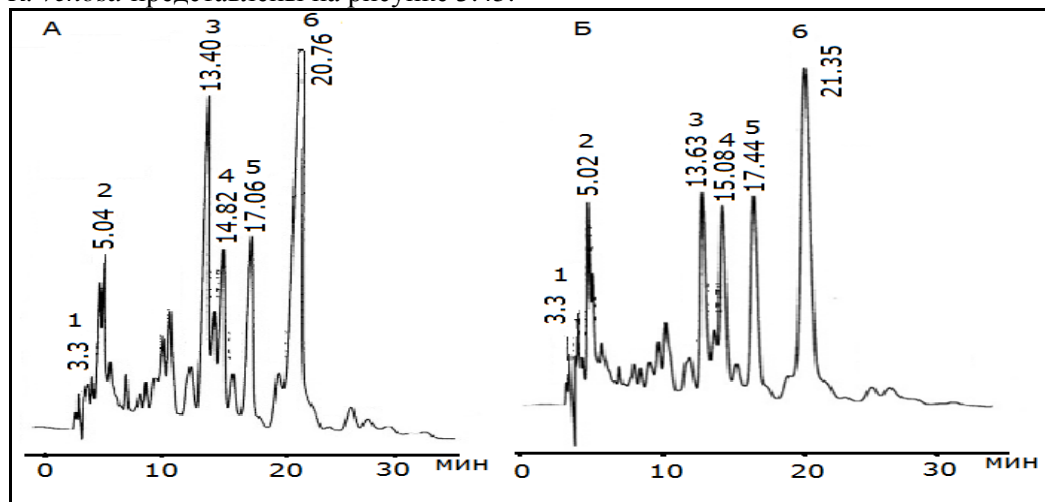


Рис. 3.45. HPLC экстрактов суммарных каротиноидов самцов (А) и самок (Б) *Rana venosa*: 1 (3.3 мин) – β -каротин, 2 (5.04; 5.02 мин, самцы и самки соответственно) – эфиры каротиноидов (до омыления), 3 (13.40; 13.63 мин) – пектенолон, 4 (14.82; 15.08 мин) – диатоксантин, 5 (17.06; 17.44 мин) – аллоксантин, 6 (20.76; 21.35 мин) – митилоксантин

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

На хроматограмме указано время выхода каждого каротиноида. Номера пигментов соотнесены с их обозначениями на ТСХ (рис. 3.42). Пять выделенных с помощью HPLC каротиноидов: β – каротин, пектенолон, диатоксантин, аллоксантин и митилоксантин – были подтверждены масс-спектрами (FAB MS) и спектрами в видимой области (в диэтиловом эфире). Полученные данные представлены в таблице 3.18. Минорные компоненты не исследовались. На HPLC показаны также эфиры каротиноидов (номер фракции – 2).

Таблица 3.18

FAB MS (величины m/z) и максимумы спектров в видимой области 5 каротиноидов *Rapana venosa*

Каротиноиды	m/z , [M ⁺]	$\lambda_{\text{макс}}$ (Et ₂ O), нм
β – каротин	536	425, 449, 475
Пектенолон	580	460
Диатоксантин	566	425, 450, 475
Аллоксантин	564	425, 451, 477
Митилоксантин	598	470

Результаты, полученные при помощи HPLC, подтвердили правильность проведенной ранее идентификации (ТСХ). Однозначно были разделены диатоксантин и аллоксантин, которые на ТСХ были представлены в одной фракции. Сложноэфирная фракция была представлена эфирами пектенолона, диатоксантина, аллоксантина и митилоксантина. После идентификации основных 5 фракций и группы эфиров каротиноидов были установлены процентные соотношения каротиноидов в суммарных экстрактах для обоих полов *R. venosa* (табл. 3.19).

Таблица 3.19

Относительное содержание каротиноидов в теле самцов и самок *Rapana venosa*

Название каротиноидов	Содержание, %	
	Самцы	Самки
β - каротин	3.1	3.7
Сложные эфиры пектенолона	4.2	3.5
Сложные эфиры диатоксантина	3.8	0.8
Сложные эфиры аллоксантина	4.2	3.9
Сложные эфиры митилоксантина	8.0	9.3
Пектенолон	15.4	11.5
Диатоксантин	10.0	10.5
Аллоксантин	10.5	11.5
Митилоксантин	27.9	29.3
Неидентифицированные каротиноиды	12.9	16.0

Из таблицы 3.19 следует, что в суммарных тканевых экстрактах рапаны было идентифицировано 84-87 % каротиноидов. Остальные фракции приходились на неидентифицированные минорные компоненты. В суммарном экстракте тканей как самцов, так и самок явно доминировал митилоксантин – 28-30 %. На остальные каротиноиды приходилось 10-15 % от общего содержания, за исключением β -каротина – 3-4 %. Доля сложных эфиров составила 17-20 %.

Таким образом, результаты, представленные в настоящем подразделе, позволяют сделать обобщения.

- Распределение суммарных каротиноидов в тканях самцов и самок *R. venosa* было сходным. Гонады являлись основным органом, накапливающим каротиноиды у *R. venosa*. На них приходилось более 60 % от общего уровня каротиноидов в суммарных экстрактах тканей моллюска.
- При помощи ТСХ, UV-VIS спектров и качественных химических реакций в суммарных экстрактах тканей *R. venosa* удалось идентифицировать 5 видов каротиноидов: β -каротин, пектенолон, смесь диатоксантина и аллоксантина, митилоксантин, а также фракцию, содержащую сложные эфиры каротиноидов.
- Применение HPLC, FAB MS методов подтвердило правильность идентификации каротиноидов в суммарных экстрактах тканей моллюска на основе ТСХ метода. Однозначно были идентифицированы β -каротин, пектенолон, диатоксантин, аллоксантин и митилоксантин, что составило 84-87 % от общего содержания каротиноидов. Доминирующей фракцией являлся митилоксантин – 28-30 %. Доля сложных эфиров составляла 17-20 %, среди которых были выявлены эфиры пектенолона, диатоксантина, аллоксантина и митилоксантина.

3.5.2. Состав и содержание каротиноидов в гонадах *R. venosa* в период нереста

Нерест – особый период в течение жизненного цикла любого гидробионта. Для этого состояния характерно изменение направленности метаболических процессов и перераспределение пластических ресурсов организма в пользу генеративной ткани. У *R. venosa* он протекает в летний период времени (июль-август) [Чухчин, 1984; Виноградова и др., 1986]. Участие каротиноидов в нем ранее не рассматривалось.

Содержание суммарных каротиноидов в гонадах самцов и самок *Rapana venosa*. Содержание каротиноидов в тканях самцов и самок *R. venosa* не совпадало. У самцов оно было существенно выше: самцы – $8,54 \pm 0,5$ мг · 100⁻¹ г сырого веса, самки – $6,28 \pm 0,3$ мг · 100⁻¹ г сырого веса. Различия составляли 36 % ($p < 0,001$). Они становились еще более заметными в период нереста, прежде всего, за счет увеличения содержания каротиноидов в гонадах самцов почти в 10 раз ($81,4 \pm 1,5$ мг · 100⁻¹ г сырого веса). Данные величины многократно превышают известные значения для других видов моллюсков [Fisher et al., 1956; Goodwin, 1984]. Прирост содержания каротиноидов в гонадах самок составил только 31 % ($p < 0,001$) и достигал $8,2 \pm 0,7$ мг · 100⁻¹ г сырого веса.

Идентификация каротиноидов при помощи ТСХ, спектров UV-VIS и качественных реакций. После получения суммарных экстрактов гонад самцов и

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

самок была применена ТСХ при разделении пигментов. Визуально ТСХ экстрактов самцов и самок были сходны между собой. Одна из полученных хроматограмм представлена на рисунке 3.46.

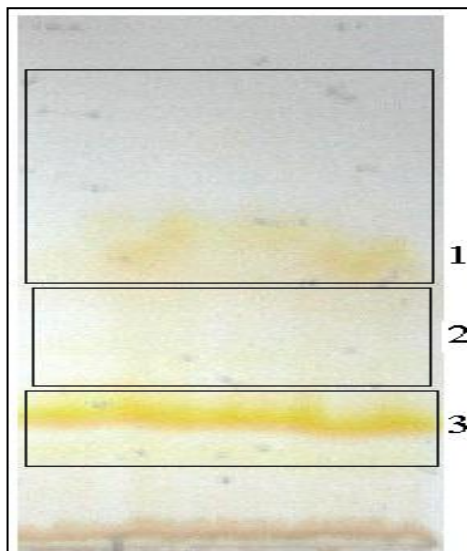


Рис. 3.46. ТСХ суммарного экстракта гонад самки *Rapana venosa*

Разделение пигментов при помощи ТСХ метода в системе ацетон : гептан (3:7), позволило визуально выделить 3 группы пигментов (показаны на рисунке). После выделения и анализа спектров видимой области в первой группе был идентифицирован пигмент, по спектру похожий на β -каротин, а в самой яркой нижней фракции удалось идентифицировать пигмент, совпадающий по спектру в видимой области с диатоксантином и аллоксантином (табл. 3.20). Для дальнейшей идентификации использовали методы колоночной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (с обращенной фазой ODS), а также масс-спектры и спектры протонного магнитного резонанса.

Таблица 3.20

Показатели R_f и максимумы UV-VIS спектров выделенных каротиноидов

Наименование	R_f	$\lambda_{\text{макс}}$ (в ацетоне), нм
β -каротин	0,88	426; 453; 480
Аллоксантин + Диатоксантин	0,36	424; 452; 480

Идентификация каротиноидов при помощи HPLC, FAB MS, 1H -NMR. При анализе экстрактов гонад самок и самцов *R. venosa* отличий в качественном составе каротиноидов между полами обнаружено не было, поэтому в дальнейшем образцы тканей объединялись. Использование метода HPLC в системе растворителей ацетон: гексан (2:8) позволило выделить и идентифицировать 8 компонентов (рис. 3.47).

Их идентификацию проводили при помощи UV-VIS спектров и FAB MS (см. ниже). Одновременно для 1-ого и 2-ого компонентов была выполнена реакция омыления. Как видно, из хроматограммы пики исчезали, что свидетельствует о присутствии среди них сложных эфиров (рис. 3.47).

Для более полной идентификации каротиноидов было выполнено

хроматографическое разделение пигментов на незакрепленном слое силикагеля и на колонке с силикагелем. Были выделены 3 группы каротиноидов.

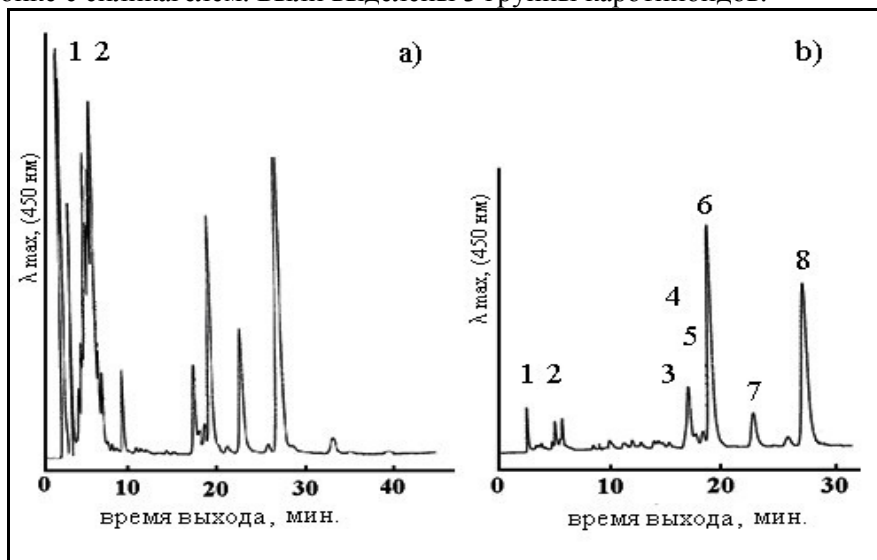


Рис. 3.47. HPLC хроматограмма каротиноидов гонад *Rapana venosa*: а) до омыления (пики: 1-диэфир аллоксантина; 2 – моноэфир аллоксантина); б) после омыления (1-2 пики отсутствуют); 3 – (9Z,9'Z)-аллоксантин; 4 – зеаксантин; 5 – диатоксантин; 6 – (all E) – аллоксантин; 7 – (7,8-дидегидрокстаксантин и 4-кетоаллоксантин); 8 – (9Z)- аллоксантин

Первую фракцию элюировали из колонки, используя 10 % раствор эфира в гексане. На ODS (колонке с обращенной фазой) она содержала β-каротин и сложные диэфиры аллоксантина. Сложные эфиры подвергали гидролизу. Показано, что в состав диэфиров аллоксантина входят стереоизомеры: аллоксантин, (9Z)-аллоксантин, (9Z,9'Z)- аллоксантин в соотношении 50:7:35.

Вторую фракцию каротиноидов вымывали 50 % раствором эфира в гексане. Результаты показали, что она состояла из моноэфиров аллоксантина. После гидролиза были получены те же три изомера аллоксантина и в том же соотношении, что и в первом случае.

Третью фракцию элюировали 100 % эфиром, она состояла из: зеаксантина, диатоксантина, аллоксантина, (9Z)-аллоксантина, (9Z,9'Z)- аллоксантина, 7,8 – дидегидроацстаксантина и 4 – кетоаллоксантина. Идентификацию проводили при помощи UV-VIS спектров и FAB MS (табл. 3.21).

Таблица 3.21

Спектральные характеристики каротиноидов гонад *Rapana venosa*

Название	FAB MS m/z, M ⁺	UV-VIS (Et ₂ O)
β-каротин	536	425, 449, 475
Диатоксантин	566	425, 450, 475
Зеаксантин	568	452, 480
7,8-дидегидроацстаксантин	590	470
4-кетоаллоксантин	576	469

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

Данные по $^1\text{H-NMR}$, масс-спектрам и спектрам в видимой области подтвердили строение (all – E), (9Z), (9Z,9'Z) – геометрических изомеров аллоксантина, описанных ранее в литературе [Маока et al., 2005; 2011; Schagerl et al., 2003]. Полученные и представленные в таблице 3.22 данные показывают аналогичное положение и взаимодействие протонов в молекуле (константы расщепления ядер водорода).

Таблица 3.22

Максимумы спектров видимой области, масс-спектров и $^1\text{H-NMR}$ каротиноидов:
(all E) – аллоксантина, (9Z,9'Z) - аллоксантина, (9Z)- аллоксантина

	Аллоксантин		(9Z)- Аллоксантин		(9Z,9'Z) -Аллоксантин	
λ макс (Et ₂ O), нм	451, 480		447, 476		445, 472	
m/z, [M+]	564		564		564	
$^1\text{H-NMR}$	мультиплет. (J in Hz)		мультиплет. (J in Hz)		мультиплет. (J in Hz)	
1	2		3		4	
2	1,41	dd (12, 12)	1,48	dd (12, 12)	1,48	dd (12, 12)
2	1,84	ddd (12, 4, 2)	1,86	ddd (12, 4, 2)	1,86	ddd (12, 4, 2)
3	3,99	m	4,01	m	4,01	m
4	2,03	dd (18, 10)	2,09	dd (18, 10)	2,09	dd (18, 10)
4	2,43	ddd (18, 6, 2)	2,46	ddd (18, 6, 2)	2,46	ddd (18, 6, 2)
10	6,46	d (11)	6,30	d (11)	6,30	d (11)
11	6,52	dd (14, 11)	6,82	dd (14, 11)	6,82	dd (14, 11)
12	6,36	d (14)	6,35	d (14)	6,35	d (14)
14	6,27	m	6,25	m	6,25	m
15	6,64	m	6,62	m	6,62	m
16	1,15	s	1,19	s	1,19	s
17	1,20	s	1,25	s	1,25	s
18	1,92	s	1,97	s	1,97	s
19	2,01	s	2,00	s	2,00	s
20	1,98	s	1,93	s	1,93	s
2'	1,41	dd (12, 12)	1,41	dd (12, 12)	1,48	dd (12,12)
2'	1,84	ddd (12, 4, 2)	1,84	ddd (12, 4, 2)	1,86	ddd (12, 4, 2)
3'	3,99	m	3,99	m	4,01	m
4'	2,03	dd (18, 10)	2,03	dd (18, 10)	2,09	dd (18, 10)
4'	2,43	ddd (18, 6, 2)	2,43	ddd (18, 6, 2)	2,46	ddd (18, 6, 2)
10'	6,46	d (11)	6,46	d (11)	6,30	d (11)
11'	6,52	dd (14, 11)	6,52	dd (14, 11)	6,82	dd (14, 11)
12'	6,36	d (14)	6,36	d (14)	6,35	d (14)
14'	6,27	m	6,27	m	6,25	m
15'	6,64	m	6,64	m	6,62	m

1	2		3		4	
16'	1,15	s	1,15	s	1,19	s
17'	1,20	s	1,20	s	1,25	s
18'	1,92	s	1,92	s	1,97	s
19'	2,01	s	2,01	s	2,00	s
20'	1,98	s	1,98	s	1,93	s

Примечания: s – синглет, d – дуплет, m – мультиплет

Таким образом, содержание каротиноидов в гонадах самцов почти на 40 % выше, чем у самок. В период нереста различия становятся еще более выраженными и достигают 10 раз. В гонадах *R. venosa* идентифицировано более 99 % каротиноидов: β -каротин, моно- и ди- эфиры аллоксантина, зеаксантин, диатоксантин, аллоксантин, (9Z)-аллоксантин, (9Z,9'Z)-аллоксантин, 7,8-дидегидроастаксантин и 4-кетоаллоксантин (табл. 3.23). При этом около 94 % от суммы этих соединений приходится на стереоизомеры аллоксантина и его моно- и диэфиры. Содержание сложных эфиров аллоксантина составляет более 40 % состава каротиноидов гонад моллюска.

Таблица 3.23

Состав каротиноидов гонад *Rapana venosa*

Виды каротиноидов	Содержание каротиноидов, %
β -каротин	1.0
Диэфир аллоксантина*	13.4
Моноэфир аллоксантина*	26.9
Зеаксантин	1.0
Диатоксантин	1.1
(транс)-Аллоксантин	23.0
(9Z)- аллоксантин	18.0
(9Z,9'Z)-аллоксантин	13.0
7,8-дидегидроастаксантин	1.0
4-кетоаллоксантин	1.0
Неидентифицированных пигментов	0.6

Примечание: *соотношение (транс)-аллоксантина, (9Z)-аллоксантина, и (9Z,9'Z)-аллоксантина: 50:7:35

Одним из неожиданных результатов настоящего раздела является факт обнаружения значительных различий в суммарном уровне каротиноидов в генеративной ткани самцов и самок *R. venosa*. Причем, если в условиях относительного функционального покоя они не превышали 40 %, то в период нереста уже достигали почти 10-ти раз и накладывали отпечаток на содержание каротиноидов в суммарных экстрактах тканей моллюска.

Причины, лежащие в основе данного феномена, по-видимому, связаны с размером мужских и женских гамет. Самки рапаны отличаются сравнительно крупными яйцеклетками [Чухчин, 1984; Гаевская, 2006]. Это означает, что семенники самцов вне нерестового периода содержат на единицу массы существенно больше сперматогониев, чем яичники оогониев. Интенсивность

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

сперматогенеза в преднерестовый период существенно выше, чем оогенеза. Это обеспечивает значительно больший прирост мужских зрелых гамет в семенниках, чем в яичниках, в расчете на единицу веса гонад. В результате различия между самцами и самками становятся еще более выраженными.

Качественный состав каротиноидов соматических и генеративных тканей представлен в таблице 3.24. Как видно, между ними существуют выраженные различия. Мажорная группа каротиноидов соматических тканей представлена митилоксантином, диатоксантином, аллоксантином и пектенолом, которые в сумме составляют более 60 % пигментов каротиноидного ряда. В генеративной ткани явно доминирует аллоксантин. В сумме со своими эфирами он составляет более 90 % состава. Митилоксантин, диатоксантин и пектенол в генеративной ткани не обнаруживаются совсем, а содержание аллоксантина минимально.

Таблица 3.24

Качественный состав каротиноидов соматических и генеративной тканей *Rapana venosa*

Виды каротиноидов	Содержание, %	
	Соматические ткани	Генеративные ткани
β-каротин	3,4	1,0
Эфиры аллоксантина	4,1	40,3
Зеаксантин	-	1,0
Диатоксантин	10,3	1,1
Аллоксантин	11,0	54,0
Пектенолон	13,5	-
Митилоксантин	28,6	-
7,8-дидегидроаэксантин	-	1,0
4-кетоллоксантин	-	1,0
Эфиры пектенолона	3,9	-
Эфиры диатоксантина	2,3	-
Эфиры митилоксантина	8,7	-
Не идентифицированных пигментов	14,5	0,6

Как уже отмечалось, в период нереста происходит перераспределение пластического материала организма в пользу генеративной ткани. Аллоксантин является типичным водорослевым пигментом. Однако получить его хищная рапана может только при питании двустворками. Накопление в генеративной ткани данного каротиноида может происходить двумя путями:

- непосредственный перевод аллоксантина из соматических тканей в генеративную;
- преобразование митилоксантина (изомитилоксантина) в аллоксантин с последующим накоплением его в генеративной ткани [Бородина и др., 2010].

Причина накопления в генеративной ткани именно аллоксантина, по-видимому, связана со структурными особенностями молекулы. Она имеет две ацетиленовые связи, короткую цепь сопряженных двойных связей и полярные гидроксильные группы. Это придает аллоксантину выраженные антиоксидантные свойства. Установлено, что каротиноиды с полярными концевыми группами располагаются возле гидрофобно-гидрофильной поверхности раздела мембран, где преимущественно и происходит свободно-радикальная атака. Отрыв атома Н от С-4 положения может быть одним из механизмов АО активности каротиноидов в этих системах [Woodall et al., 1997].

3.5.3. Вероятные пути трансформации каротиноидов в трофической цепи «моллюск-фильтратор→моллюск-хищник».

Трофическую систему: «моллюск-фильтратор → моллюск-хищник», целесообразно рассмотреть на примере изученных каротиноидов двустворчатых моллюсков и рапаны. Это известная пищевая цепь для черноморского региона. Более того, считается, что трофические отношения между этими видами являются причиной сокращения численности популяций мидии и устрицы, отмечаемые в работах ряда авторов [Гаевская, 2006; Иванов и др., 2008]. Целесообразность рассмотрения данной трофической связи вытекает также из того, что состав каротиноидов этих двустворчатых моллюсков изучен в настоящей работе наиболее полно.

В таблице 3.25 представлена информация о составе каротиноидов в суммарных экстрактах мидий и рапаны. Как видно, состав каротиноидов суммарных экстрактов тканей рапаны имеет ряд особенностей.

Рапана не отличается разнообразием состава каротиноидов. В тканях явно доминируют пектенолон, диатоксантин, аллоксантин и митилоксантин, причем значительную долю составляют их сложные эфиры. В определенной степени это можно объяснить тем, что у рапаны не удалось идентифицировать около 14 % каротиноидов, то есть спектр их может быть значительно шире. Особенно это касается минорных компонентов, которые в таблице для этого вида фактически не представлены.

Основные каротиноиды тела рапаны совпадают с таковыми у мидии, в связи с этим можно допустить, что их присутствие является следствием обычной аккумуляции, а не метаболической трансформации.

Однако непонятно, почему такие каротиноиды, как красностреаксантин А, пектенол А, 19'-гексаноилоксифукоксантинол, фукоксантин, фукоксантинол и особенно галацинтиаксантин и гетероксантин не регистрируются у рапаны (в табл. 3.25 показаны как *). Отсюда можно допустить, что именно они и подвергаются метаболической трансформации.

О существовании метаболической трансформации свидетельствует также высокий уровень сложных эфиров пектенолона, диатоксантина, аллоксантина и митилоксантина и наличие 3-х изомерных форм аллоксантина. Последний явно доминирует в гонадах моллюска.

По своему составу *R. venosa* отличается и от других хищных видов гастропод [Matsuno et al., 1984; Katagiri et al., 1986; Maoka, Matsuno, 1989]. Для гастропод известны 2 пути метаболизма каротиноидов: по окислительному пути от

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

β -каротина до 3S, 3'S-астаксантина и по восстановительным путям от лютеина до фритцелоксантина, и от кантаксантина до 4,4'-гидроксипиррардиксантина [Katagiri et al., 1986; Маока, 2011]. Однако в тканях рапаны не наблюдались эти виды каротиноидов, что существенно отличает ее от других изученных гастропод. Присутствие же β -каротина и 7,8-дидегидроастаксантина предполагает возможным окислительный путь трансформации, как у гастропод *Fusinus perplexus*, однако высокое содержание аллоксантина и его изомеров, а также эфиров указывает на преобладание других путей метаболизма.

Таблица 3.25

Сравнительная оценка состава каротиноидов в суммарных экстрактах тканей мидии и рапаны

Виды каротиноидов	Содержание, %	
	Мидия	Рапана
β -каротин	+	+
8'-апоаллоксантинол	+	-
Крассостреаксантин А	+	*
Крассостреаксантин В	+	-
19'-гексаноилоксикрассостреаксантин А	+	-
Пектенолон (с учетом эфиров и изомеров)	+	+
Диатоксантин (с учетом эфиров)	+	+
Аллоксантин (с учетом эфиров)	+	+
Митилоксантин (с учетом эфиров)	+	+
Зеаксантин	+	-
19'-гексаноилоксимитилоксантин	+	-
Галацантиаксантин	+	*
19'-гексаноилоксигалоцантиаксантин	+	-
Пектенол А	+	*
Фукоксантин	+	*
19'-гексаноилоксифукоксантин	+	-
Гетероксантин	+	*
Фукоксантинол	+	*
19'-гексаноилоксифукоксантинол	+	*
19-гексаноилоксиалленикмитилоксантин	+	-
Перидинин	+	-
Пирроксантинол	+	-
4-кетоаллоксантин	-	+
7,8-дидегидроастаксантин	-	+

Примечание: * – отсутствие мажорных каротиноидов жертвы в теле хищника

Ниже предлагается вероятная схема трансформации каротиноидов в теле рапаны (рис. 3.48). Она имеет много общего с метаболизмом *Acanthaster planci* [Маока, 2011] и позволяет определить пути трансформации фукоксантина, фукоксантинола и галацантиаксантина, которые не обнаруживаются в теле рапаны, до митилоксантина, аллоксантина, а также их эфиров и изомеров (1) и пути трансформации диатоксантина до 7,8-дидегидроастаксантина (2). Схема (1) имеет ряд дополнений к известной для *Acanthaster planci* на этапе митилоксантина, поскольку изомитилоксантина в тканях рапаны обнаружено не было.

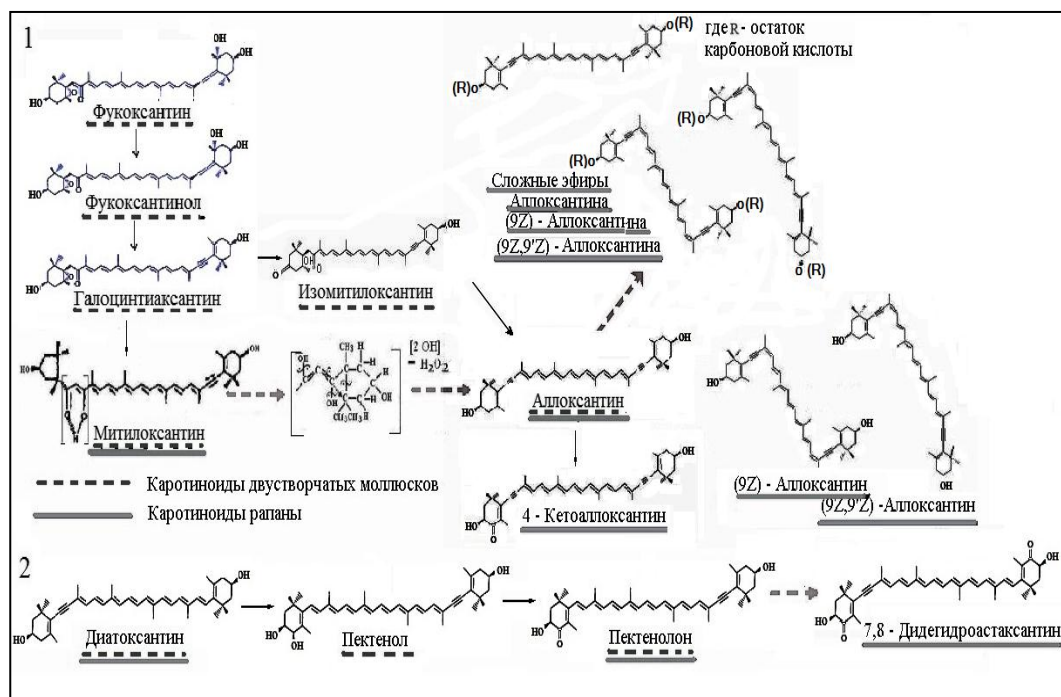


Рис. 3.48. Вероятные пути трансформации каротиноидов в теле моллюска-хищника *Rapana venosa*

В схеме (1) показан также дополнительный путь образования молекул аллоксантина (прерывистыми стрелками). Квадратными скобками выделена кетенольная группировка в молекуле митилоксантина, подвергающаяся дальнейшей трансформации. На следующем этапе она изомеризуется в диоксиалленовую и затем происходит свободнорадикальное расщепление двух оксигрупп и циклопентановой связи. В последующем из алленовой группы образуется ацетиленовая и циклогексановое кольцо, что показано для моллюсков [Britton et al., 1998; Бородина и др., 2010]. Из двух гидроксильных радикалов образуется перекись водорода, которая разрушается в теле рапаны под действием каталазы. В результате, молекулярная масса митилоксантина уменьшается на 34 единицы, то есть массу перекиси водорода. В дальнейшем, помимо трансаллоксантина, образуются еще 2 его изомера (9Z) и (9Z,9'Z), из которых также формируются сложные эфиры аллоксантина. Одновременно аллоксантин может трансформироваться в 4-кетоаллоксантин. Отсюда следует, что разнообразие

Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков

каротиноидов у рапаны формируется в основном за счет структурной модификации аллоксантина, что отличает *Rapana venosa* от других хищных видов гастропод.

Присутствие пектенолона и диатоксантина в тканях рапаны может быть объяснено как аккумуляцией этих соединений в процессе питания, так и трансформацией диатоксантина в пектенолон (рис. 3.48, схема 2). Этот процесс хорошо известен для двустворчатых моллюсков-фильтраторов [Britton et al., 1998], однако в черноморском регионе для этих моллюсков он осуществляется только до пектенолона включительно.

Таким образом, предлагаемая схема трансформации каротиноидов в трофической цепи «моллюск-фильтратор – моллюск-хищник», на примере основных каротиноидов двустворчатых моллюсков Черного моря и *R. venosa* предполагает накопление в тканях хищника аллоксантина как основного диациетиленового каротиноида (с учетом всех его изомерных и эфирных форм), а также митилоксантина, пектенолона и диатоксантина. Это может быть следствием, как метаболической трансформации, так и частичной аккумуляции этих соединений в процессе питания. Необходимо также отметить, что состав каротиноидов у *R. venosa* был изучен не полностью (около 84-87 %). Практически отсутствует информация о содержании минорных компонентов. Это означает, что пути метаболической информации каротиноидов в теле *R. venosa* в перспективе могут быть уточнены.

* * *

Результаты, представленные в настоящей главе, позволяют сделать ряд обобщений. Впервые, благодаря применению комплекса современных методов исследования, удалось идентифицировать наиболее широкий спектр каротиноидов в тканях массовых видов черноморских моллюсков: *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Crassostrea gigas* Th., *Anadara inaequalvis* Br., *Rapana venosa* Val. Это важно не только с научной, но и с практической точки зрения, так как позволяет говорить об их пищевой ценности. Следует напомнить, что *M. galloprovincialis* и *C. gigas* являются объектами марикультуры в черноморском регионе, а *A. inaequalvis* и *R. venosa* рассматриваются в качестве таковых на ближайшую перспективу.

У *M. galloprovincialis* идентифицировано 20 каротиноидов (около 99 % состава), у *C. gigas* – 10 каротиноидов (76 % состава), у *A. inaequalvis* – 6 каротиноидов (более 90 % состава), *R. venosa* – 6 каротиноидов (около 85 % состава). При этом у *M. galloprovincialis* в минорном количестве обнаружены три новых 19'-гексаноилокси-каротиноида: 19'-гексаноилоксигалоцинтиаксантин, 19'-гексаноилокси-красостреаксантин А, 19'-гексаноилоксимитилоксантин, – что позволило впервые предложить новую схему метаболической трансформации этой группы соединений.

Необходимо отметить, что двустворчатые моллюски *A. inaequalvis*, *M. galloprovincialis* и *C. gigas* находились в одинаковых условиях и материал собирался одномоментно. Это исключает влияние среды и спектров питания на состояние животных, что важно при проведении сравнительных исследований. При этом в тканях моллюсков было выявлено только три общих каротиноида: аллоксантин, диатоксантин и пектенол А – и отмечена значительная

Глава 3

видоспецифичность их качественного состава. Это означает, что процессы метаболизма соединений каротиноидного ряда имеют явную видовую специфику. У *M. galloprovincialis* различия обнаружены и на внутривидовом уровне (цветовые морфы), что, вероятно, имеет генетическую основу.

У всех вышеперечисленных двустворчатых моллюсков определены мажорные и минорные группы каротиноидов. Последнее позволило перейти к анализу вероятных путей метаболизма соединений каротиноидного ряда. Сделано предположение, что в их основе лежит преобразование двух водорослевых пигментов: фукоксантина и диатоксантина, источником которых могут быть в основном диатомовые и динофитовые микроводоросли. Они определяют как общность, так и специфичность спектра каротиноидов тканей исследованных видов двустворок. Предложена также метаболическая схема трансформации каротиноидов в трофической цепи «моллюски-фильтраторы → моллюски-хищники», которая основана на накоплении в тканях хищника алло- и диатоксантина и их производных.

Показано, что содержание и состав каротиноидов тканей моллюсков не являются постоянными величинами и зависят от условий среды (прежде всего, спектра питания) и состояния организма. Изучение динамики этих показателей у *A. inaequalvis* в течение февраля-июня позволило констатировать наличие связи с сукцессией диатомовых и динофитовых в прибрежных акваториях. Это подтверждает высказанное нами предположение о том, что эти составляющие фитопланктона являются основными источниками каротиноидов для моллюсков-фильтраторов.

Сравнительная оценка содержания и качественного состава каротиноидов соматических и генеративных тканей у *R. venosa* показала, что в период нереста гонады самцов и самок избирательно накапливают аллоксантин и его производные (эферы). При этом на генеративную ткань приходится до 60 % от общего содержания каротиноидов в теле моллюска. Высказано предположение, что это связано с особенностями строения данного пигмента: присутствием двух ацетиленовых связей, наличием короткой цепи сопряженных двойных связей и полярных гидроксильных групп, что придает ему выраженные антиоксидантные свойства.

Глава 4

СПЕЦИФИКА ТКАНЕВОГО МЕТАБОЛИЗМА У ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BRUGUIERE, 1789)

Anadara inaequalvis (Bruguiere, 1789) в ряде работ проходит под названием *Scapharca* (реже *Arca*) *inaequalvis*, *Cunearca cornea* [Chiancone et al., 1981; Corni, Cattani, 1989; Чикина и др., 2003; Andreani et al., 2011]. В настоящее время эти названия считаются устаревшими, но продолжают употребляться преимущественно в работах физиологического и биохимического профиля [Isani et al., 1986; Mistri et al., 1988; Holden, 1994]. Систематическое положение вида:

Тип – Mollusca

Класс – Bivalvia

Подкласс – Pteriomorpha

Отряд – Arcoida

Семейство – Arcidae

Род – *Anadara*

Вид – *Anadara inaequalvis* (Bruguiere, 1789).

В настоящей главе представлена информация о различных аспектах тканевого метаболизма *A. inaequalvis* с акцентом на устойчивость этого вида к гипоксии, аноксии и голоданию.

4.1. Особенности биологии и физиологии *A. inaequalvis*

A. inaequalvis широко распространена в Индийском и Тихом океанах. Распределение моллюска отмечается от центра Индийского океана к западу Тихого океана, от Индии и Шри-Ланки к Индонезии, от севера Японии на юг к северу Австралии [Habe, 1965]. В Средиземное море моллюск попал из Атлантики в 1969 году и быстро распространился. В 1981 году моллюск был обнаружен по всему шельфу западной части Черного моря [Gomoiu, 1984; Золотарев, Золотарев, 1987]. В 1986 году анадара обнаружена на северо-западном шельфе Черного моря. Считается, что появление этого моллюска в Черном море вызвано переносом личинок судами с балластными водами. Проникновение анадары связывают также с миграцией в черноморский регион из Адриатического моря [Zolotarev, 1996]. К 1994 году моллюск успешно освоил всю южную часть Азовского моря [Чихачев и др., 1994]. В 1999 впервые наличие анадары было зарегистрировано на южном берегу Крыма на глубине 23 м (Карадаг, район Алушты) [Revkov et al., 2002]. Затем впервые в планктоне были обнаружены личинки *A. inaequalvis* [Безвушко, 2001]. Уже в 2000 году анадара являлась массовым компонентом в береговых выбросах Керченского пролива [Анистратенко и др., 2000; Анистратенко, Халиман, 2006]. В настоящее время *A. inaequalvis* является доминирующим видом в макрозообентосных сообществах Северокавказского и Северо-западного шельфа Черного моря [Колючкина, Исмаилов, 2007; Еремеев и др., 2009].

4.1.1. Внешнее строение

Раковина анадара твердая, массивная, тяжелая, вздутая (рис. 4.1А). Достаточно неравностворчатая у молодых особей, левая створка отчетливо накладывается на правую: вентрально и сзади. При этом у взрослых экземпляров различия не столь заметны. Раковина очень изменчива по форме, толщине и выпуклости ребер. Отношение высоты к длине: 0,69-0,88, ширины к длине: 0,53-0,84. Вершины створок немного смещены от середины к переднему краю. Замочный кант состоит из непрерывного ряда однородных зубцов (40-50 шт.). Нижние края створок изнутри зазубрены. Каждая створка раковины состоит из приблизительно 33 радиальных ребер (30-36 шт.), которые имеют одинаковую с промежутками ширину [Morton,1983]. Кардинальная область довольно длинная и узкая. Периостракум хорошо развит, имеет темный коричнево-черный цвет и находится около краев раковины. У края раковины изнутри имеется рельеф, соответствующий ребрам наружной поверхности. Окраска раковины светлая ближе к белому, иногда кремовая [Анистратенко, Халиман, 2006]. Средний размер достигает 70-80 мм, максимальный – 95 мм в длину, 61 мм в высоту [Broom,1980; Broom,1985; Rinaldi 1985]. Анадара – активный моллюск, способный передвигаться на значительные расстояния за счет мощной ноги. Ткани интенсивно окрашены в оранжевый цвет, что свидетельствует о высоком содержании каротиноидов (рис. 4.1Б) [Бородина и др., 2009].

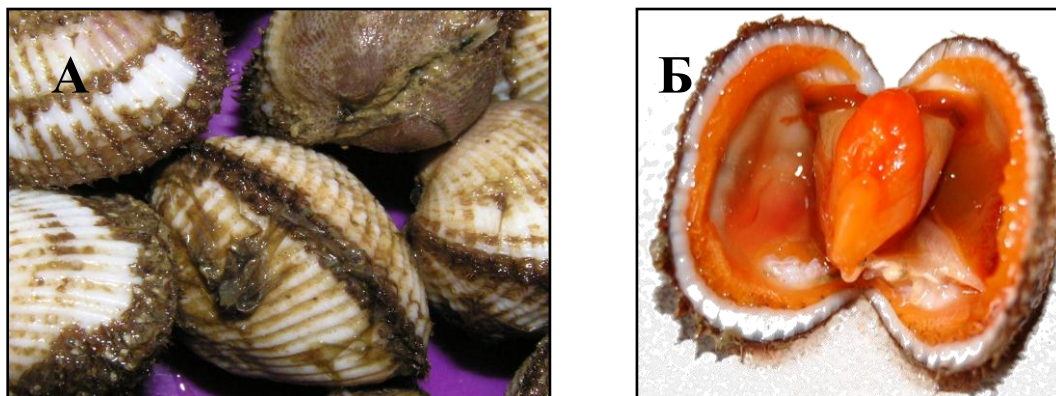


Рис. 4.1. Внешний вид *A. inaequalvis* (А) и после вскрытия створок (Б)

4.1.2. Условия обитания

A. inaequalvis является эвритермным [Broom,1980; Boonruang, Janekam,1983] и эвригалинным [Broom,1980; Yankson, 1982] видом, легко переносит гипоксические и аноксические условия [Isani et al., 1989]. Несмотря на то, что максимальное распространение соответствует областям с соленостью около 30 ‰, моллюск переносит опреснение до 10-11 ‰ [Чихачев и др., 1994], а в Андриатике встречается даже в солоноватоводных лагунах [Sahin et al., 2006]. По литературным данным, анадара в основном является обитателем мягких субстратов: песчаного и илистого, при этом она встречается на глубине до 30 м

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

[Lim, 1966]. В Азовском море анадара обитает на всех глубинах, вплоть до 10-11 м, на илистых, илисто-песчаных грунтах [Чихачев и др., 1994]. В Черном море моллюск встречается на различных грунтах на глубине от 3 до 60 м с максимальной плотностью в диапазоне от 5 до 25 м [Sahin et al., 2009]. При этом анадара вытесняет другие виды двустворок, обитавших на таких субстратах. В отдельных районах происходит увеличение общей биомассы зообентоса за счет формирования самостоятельного зооценоза анадары [Колочкина, Исмаилов, 2007].

По типу питания моллюск является фильтратором-сестонофагом и является важным звеном процесса самоочищения водоема.

4.1.3. Размножение

Половое созревание *A. inaequalvis* происходит на 2-3-м году жизни при длине раковины около 10 мм [Чикина и др., 2003], 20 мм [Sahin et al., 2006]. Как у всех представителей семейства *Arcidae*, размножение происходит со стадией планктонной личинки, которая предпочитает верхние и средние горизонты (0-25 м) [Казанкова, 2002]. По другим данным, существует корреляция между периодом выметывания личинок, температурой и соленостью воды [Beukema, 1982; Mistri et al., 1988].

Гаметогенез начинается в мае и продолжается до октября. Нерест установлен с июня по октябрь с различной интенсивностью. Репродуктивная пауза в основном наблюдалась с ноября по апрель [Corni, Cattani, 1989; Чикина и др., 2003]. В ряде работ отмечается негативная корреляция между оседанием личинок и численностью взрослых моллюсков [Mistri et al., 1988; Чикина и др., 2003]. Есть предположение, что механизм, не позволяющий личинкам оседать рядом с взрослыми особями, связан с выбросом моллюсками в воду отпугивающих молодых веществ [Чикина и др., 2003].

Экспериментально изучен набор хромосом у *A. inaequalvis*. У женских и мужских экземпляров он составил: $n = 19$ и $2n = 38$. Были обнаружены главным образом метацентрические и субметацентрические хромосомы [Corni, Trentini, 1988].

Популяция *A. inaequalvis* характеризуется медленным ростом отдельных особей, достаточно продолжительной жизнью, скудным пополнением за счет вновь осевших экземпляров и низкой долей смертности взрослых особей [Чикина и др., 2003].

4.1.4. Особенности физиологии

Адаптивная способность двустворчатых моллюсков к гипоксии и аноксии во многом зависит от свойств гемолимфы. Клетки гемолимфы выполняют ряд защитных функций, участвуют в воспалительных реакциях [Coombe et al., 1984; Федоров, 2004], пищеварении, экскреции, а также восстановлении раковины [Ratcliff, Rowley, 1979].

Экспериментально установлено, что гемолимфа анадары содержит четыре типа клеток (гемоцитов): наиболее многочисленные красные клетки – эритроциты, содержащие гемоглобин, и три вида белых клеток [Holden et al., 1994]. Эритроциты представляют собой клетки, содержащие плотные цитоплазматические гранулы и

различные органоиды. Обнаружен хорошо развитый аппарат Гольджи, неровный эндоплазматический ретикулум, непостоянное число митохондрий и мелкие цитоплазматические микроканальца. Белые клетки встречались гораздо реже и в меньшем количестве. Первый тип белых клеток представлен ацидофильными, цитоплазматическими гранулированными клетками с высокой степенью вакуолизации. Клетки второго типа представлены базофилами, практически не содержащими цитоплазматических гранул. Клетки третьего типа малочисленны. Они имеют относительно большие, плотные, ацидофильные гранулы [Holden et al., 1994].

Наличие эритроцитарного гемоглобина предполагает соответственно высокую кислородную емкость [Cortesi et al., 1992]. Это качество позволяет предположить наличие особенностей в организации тканевого метаболизма у данного вида [Carpene et al., 1985; Zwaan et al., 1991; Zwaan et al., 1992]. Общеизвестно, что животные, содержащие дыхательные пигменты, обладают способностью регулировать скорость дыхания до тех пор, пока напряжение кислорода не падает ниже критического уровня [Константинов, 1986].

Эритроциты анадары содержат два типа гемоглобина (HbI и HbII), которые имеют характерные сходные структурные и функциональные свойства, однако имеют и ряд отличий [Mitomi et al., 1973; Furuta et al., 1977; Chiancone et al., 1981; Boffi et al., 1987]. HbII – тетрамер, состоит из двух пар полипептидных цепей А и В, отличающихся только одной заменой последовательности аминокислот в структуре В цепи [Piro et al., 1996]. HbI – димер, молекула которого состоит из одной полипептидной цепи, отличной от цепей тетрамера молекулярным весом и изоэлектрической точкой [Furuta et al., 1977; Chiancone et al., 1981; Boffi et al., 1987].

С функциональной точки зрения димерный компонент показывает высокую кооперативность в связывании кислорода и постоянное сродство к кислороду при рН 5,5-9,0 [Chiancone et al., 1981; Boffi et al., 1991]. Тетрамерный компонент обнаруживает аналогичную кооперативность в связывании кислорода, но имеет более низкую величину кислородного сродства при нейтральном и щелочном значении рН и повышает ее в значении рН ниже 6,5 – эффект Бора [Chiancone et al., 1981]. Получены данные о том, что HbI в кристаллическом состоянии сохраняет положительную кооперативность в связывании лиганда [Mozzarelli et al., 1996].

Димерный и тетрамерный гемоглобин слабо взаимодействуют с ионами натрия, но отличаются по их взаимодействиям с хлорид ионами. Димерный гемоглобин обнаруживает низкое сродство с хлорид ионами, а тетрамерный белок имеет участки высокого сродства [Chiancone et al., 1988]. Показано также, что гемоглобин анадары особо чувствителен к осмотическим условиям. Увеличенное осмотическое давление, понижающее кислородное сродство в гемоглобине человека, увеличивает его в гемоглобине моллюска независимо от растворителя (глицерин, глюкоза или сахароза) [Royer et al., 1996].

Имеется информация о том, что гемолимфа двустворчатого моллюска *A. inaequalis* содержит в дополнение к гемоглобину необычный гем, содержащий гематин. В гемолимфе моллюска гематин эффективно отделен от гемоглобина [Vismann, 1993].

Моллюск *A. inaequalis* даже в чрезвычайных низких концентрациях кислорода (менее 1,2 % насыщения) удерживает норму потребления кислорода

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

[Cortesi et al.,1992], а в условиях аноксии показывает минимальные энергетические траты. Так, при экспериментальной аноксии скорость снижения АТФ в тканях анадары была вдвое ниже, чем у *Venus gallina* и *Mytilus galloprovincialis*. Можно говорить о том, что имеет место согласование процессов дыхания и фосфорилирования для получения энергии клеткой при экстремальной гипоксии [Zwaan et al.,1991; Zwaan et al.,1992].

В условиях экспериментальной аноксии в замкнутой и проточной системах было изучено время выживания двустворчатых моллюсков *Chamelea gallina*, *Cerastoderma edule* и *A. inaequalvis*, собранных из двух различных экосистем. Данные виды считаются устойчивыми к гипоксии и аноксии. Для *Chamelea gallina* гибель отмечали на 2,5 и 2,4 день, для *Cerastoderma edule* – на 2,7 и 2,9 день соответственно для закрытой и проточной систем. *A. inaequalvis* показала самое длительное время выживания в условиях аноксии – 14,4 дня. Считается, что это связано с наличием гемоглобина в гемолимфе моллюска [Zwaan et al., 2002].

4.1.5. Специфика тканевого метаболизма

Как показали исследования, *A. inaequalvis* имеет высокоэффективный анаэробный тканевой метаболизм. Это позволяет ей длительный период времени пережить условия экстремальной гипоксии и аноксии [Meinardus-Hager, Gäde, 1986]. Так же как и другим моллюскам *A. inaequalvis* свойственно подавление аэробного метаболизма в условиях гипоксии, но эта особенность у нее более выражена, чем у других видов [Boonruang, Janekam, 1983]. Кроме того, раковина анадары содержит большие количества свободного D-аспартата, который вовлечен в анаэробный метаболизм, так же как и L-аспартат [Larade, Storey, 2002]. Известно, что у животных с высокими запасами аспартата аспартат-сукцинатное направление метаболизма может обеспечить достаточный ресинтез АТФ в течение внешнего анаэробноза [Mistri et al., 1988].

По мнению ряда авторов, в условиях экспериментальной гипоксии моллюск *A. inaequalvis* в течение первых часов поддерживает тканевое дыхание за счет эндогенных ресурсов кислорода. В последующие часы отмечается снижение количества аспартата, которое равно сумме увеличения содержания малата и сукцината [Boonruang, Janekam, 1983; Morton,1983; Nicholson, 2002; Колючкина, Исмаилов, 2007]. Активное использование аспартата авторы связывают с преобразованием глюкозы в аланин. После 12 ч гипоксии дальнейшее использование аспартата прекращается, но аланин, малат и сукцинат продолжают накапливаться, при этом инициируется накопление пропионата в клетках ткани. Это означает, что происходит постепенный сдвиг в сторону преобразования пирувата в оксалацетат и фосфоенолпируват [Boonruang, Janekam, 1983; Morton,1983; Nicholson,2002; Колючкина, Исмаилов, 2007]. В течение первых 4 дней аноксии наблюдается постепенное увеличение содержания глюкозы (гипергликемия). Главными конечными продуктами анаэробноза являются аланин и сукцинат, который затем превращается в пропионат, при этом накопление лактата не наблюдается [Boonruang, Janekam, 1983; Morton, 1983; Nicholson, 2002; Колючкина, Исмаилов, 2007]. Следует отметить, что накопление аланина и сукцината в тканях в условиях дефицита кислорода отмечено и для ряда морских и пресноводных рыб, а также моллюсков [Горомосова, Шапиро, 1984].

Таким образом, особенности биологии и экологии *A. inaequalvis* позволяют констатировать, что данный вид основную часть жизненного цикла проводит в среде с крайним дефицитом кислорода и периодической аноксией. Имеющийся физиологический и метаболический потенциал позволяет поддерживать аэробный метаболизм в тканях при крайне низком насыщении воды кислородом, а также использовать высоко эффективные процессы анаэробного ресинтеза макроэргов. Однако многие аспекты этой устойчивости остаются открытыми, в частности механизмы, определяющие продолжительное существование этого вида в условиях аноксии. Они и составляют предмет настоящего исследования, которое позволит расширить представление о биоэнергетических аспектах жизни в отсутствии кислорода.

4.2. Сравнительная оценка тканевого метаболизма у *A. inaequalvis* и *M. galloprovincialis* при нормоксии

Материал для проведения сравнительных исследований был собран одновременно с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия “Дон-Комп” (бухта Стрелецкая, г. Севастополь) в ноябре 2004 года. Транспортировку животных осуществляли в пластмассовых контейнерах насыпью без воды в течение 1 часа от момента сбора.

После транспортировки для снятия реакции стресса животных выдерживали в стеклянных аквариумах объемом 30 л с проточной морской водой в течение 2-3 суток. Считается, что этот период времени является достаточным для восстановления функциональных характеристик моллюсков [Wenning, 1988; Ribera, 1989]. Температуру воды в аквариумах поддерживали на уровне $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Соленость воды составляла 17-18 ‰. Фотопериод – 12 часов день: 12 часов ночь. Концентрация кислорода в воде на протяжении эксперимента сохранялась на уровне 8,5-8,7 мг л⁻¹.

4.2.1. Непрямая калориметрия

Интегральным показателем метаболизма является интенсивность потребления кислорода особями. У исследуемых видов моллюсков с равной массой мягких тканей в условиях нормоксии и при температуре воды 17-20°C значения данного показателя имели явные отличия. У *A. inaequalvis* интенсивность потребления кислорода составила $0,040 \pm 0,014$ мг O₂ экз⁻¹ час⁻¹, что в 7 раз ($p < 0,001$) ниже, чем у *M. galloprovincialis* – $0,284 \pm 0,065$ мг O₂ экз⁻¹ час⁻¹ [Солдатов и др., 2005]. Это предполагает наличие принципиальных особенностей в организации тканевого метаболизма у данных видов двустворок. Следует ожидать, что в тканях *A. inaequalvis* должны преобладать анаэробные процессы.

4.2.2. Характеристики углеводного обмена

Направленность метаболических процессов в организме обоих видов имела выраженную тканевую специфику. Распределение активностей МДГ и ЛДГ по тканям совпадало у обоих видов двустворок. Максимум наблюдался в ноге (рис. 4.2). В гепатопанкреасе и жабрах активности были в 1,5-5,0 раз ниже ($p < 0,001$) [Солдатов и др., 2009].

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

Межвидовое сравнение показало присутствие высоко эффективной МДГ во всех типах тканей *A. inaequalvis* [Солдатов и др., 2009]. Активность данного фермента в гепатопанкреасе и жабрах в 5-6 раз ($p < 0,001$) превышала значения, отмеченные для *M. galloprovincialis*. В ноге различия были менее выражены и составили 41,3 % ($p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены и в отношении ЛДГ. Превышение активности данного фермента у *A. inaequalvis* также было зарегистрировано для всех типов тканей и составляло 2-4 раза ($p < 0,001$).

У обоих видов моллюсков максимальное содержание глюкозы отмечали в гепатопанкреасе (табл. 4.1). В остальных тканях оно было в 3-7 раз ниже ($p < 0,001$). Близкая зависимость отмечена и в отношении лактата и пирувата для тканей *A. inaequalvis* [Солдатов и др., 2009]. У *M. galloprovincialis* уровень этих соединений в ноге и гепатопанкреасе был близким. Отношение лактат/пируват совпадало практически во всех тканях и находилось на уровне 9,5-12,0 единиц.

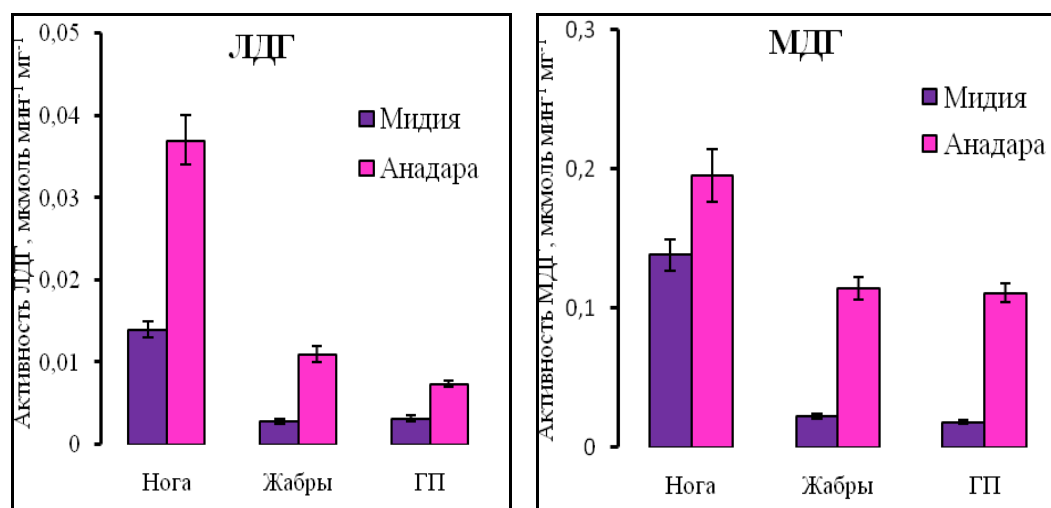


Рис. 4.2. Сравнительная оценка активностей ЛДГ и МДГ в тканях *M. galloprovincialis* и *A. inaequalvis*

Существенные различия были отмечены на межвидовом уровне [Солдатов и др., 2009]. В сравнении с *M. galloprovincialis* содержание глюкозы в гепатопанкреасе и ноге *A. inaequalvis* было в 2-4 раза ниже (нога – $p < 0,01$; гепатопанкреас – $p < 0,001$) (табл. 3.1). В жабрах же различия не были статистически выражены. Содержание лактата и пирувата (жабры, гепатопанкреас), напротив, было повышено в 1,5-2,4 раза ($p < 0,001$). В ноге моллюсков картина была обратной. Уровень лактата и пирувата у *A. inaequalvis* был явно снижен. Значения индекса лактат/пируват были близкими у обоих видов моллюсков.

Таким образом, в сравнении с *M. galloprovincialis*, ткани толерантной к гипоксии и аноксии *A. inaequalvis* в условиях нормального содержания кислорода в среде отличались следующими особенностями:

- в них обнаруживалась чрезвычайно высокая активность МДГ и ЛДГ;
- содержание глюкозы было существенно снижено;
- уровень лактата и пирувата в гепатопанкреасе и жабрах был явно повышен;

- в ноге, напротив, содержание лактата и пирувата было в 2-3 раза меньше, чем у мидий.

Таблица 4.1

Сравнительная оценка содержания глюкозы и углеводных метаболитов в тканях *M. galloprovincialis* и *A. inaequalvis*

Показатели	Виды тканей и моллюсков					
	Гепатопанкреас		Жабры		Нога	
	Мидия	Анадара	Мидия	Анадара	Мидия	Анадара
Глюкоза, нмоль мг ⁻¹	23,6±2,2 (10)	11,4±0,6 (10)	2,95±1,07 (10)	3,80±0,65 (10)	6,11±1,41 (10)	1,55±0,59 (10)
Лактат, нмоль мг ⁻¹	6,67±0,63 (10)	10,2±2,1 (10)	2,81±0,29 (10)	6,73±1,28 (10)	8,35±1,18 (10)	2,86±0,42 (10)
Пируват, нмоль мг ⁻¹	0,72±0,08 (10)	1,07±0,20 (10)	0,39±0,05 (10)	0,69±0,09 (10)	1,10±0,35 (10)	0,39±0,11 (10)
Лактат/Пируват	9,7 ± 0,6 (10)	10,2 ± 2,0 (10)	9,5 ± 2,2 (10)	9,7 ± 1,2 (10)	11,6 ± 2,1 (10)	9,4 ± 1,4 (10)

Примечание: в скобках указано число особей

Такое соотношение показателей свидетельствует о более активном течении гликолитических процессов в тканевых структурах *A. inaequalvis*. Они предполагают использование углеводных субстратов, что хорошо согласуется с низким уровнем глюкозы и высоким содержанием лактата в тканях моллюска. Однако этот процесс должен иметь ограничение, так как может привести к развитию тканевого ацидоза и общей разбалансировке метаболических процессов.

Высокая активность МДГ, наблюдаемая в тканях моллюска, исключает чрезмерное накопление лактата. Известно, что цитоплазматическая фракция МДГ сопряжена с гликолитическими процессами через ФЕПМК [Skorkowski, 1988], превращающей фосфоенолпируват в оксалоацетат (рис. 4.3). МДГ восстанавливает оксалоацетат до малата, который затем посредством малат-сукцинатного переносчика направляется в митохондрии и доводится ферментами ветви цикла Кребса, при участии митохондриальной МДГ, до сукцината. Подобная ориентация метаболизма ограничивает поток углеводных субстратов в направлении лактата, исключая его чрезмерное накопление, и сохраняет энергетический статус ткани. Она описана для ряда гидробионтов [Шапиро, Бобкова, 1975; Almeida-Val et al., 2000] и имеет функциональный смысл в условиях экстремальной гипоксии и аноксии [Шапиро, Бобкова, 1975; Almeida-Val et al., 2000]. Парадоксальность ситуации состоит в том, что у *A. inaequalvis* эти процессы реализуются на уровне жабр и гепатопанкреаса в условиях внешней нормоксии, а не гипоксии.

В отличие от гепатопанкреаса и жабр, ориентация метаболизма в ткани ноги *A. inaequalvis* была иной. Уровень лактата и пирувата здесь был в 2-3 раза меньше ($p < 0,001$), чем у *M. galloprovincialis*, а индекс лактат/пируват имел более низкие значения. Активности МДГ и ЛДГ были повышены, но различия между моллюсками не столь выражены. Сравнительная оценка позволяет говорить о том, что метаболизм в данном органе у *A. inaequalvis* скорее имел аэробную, а не анаэробную ориентацию.

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

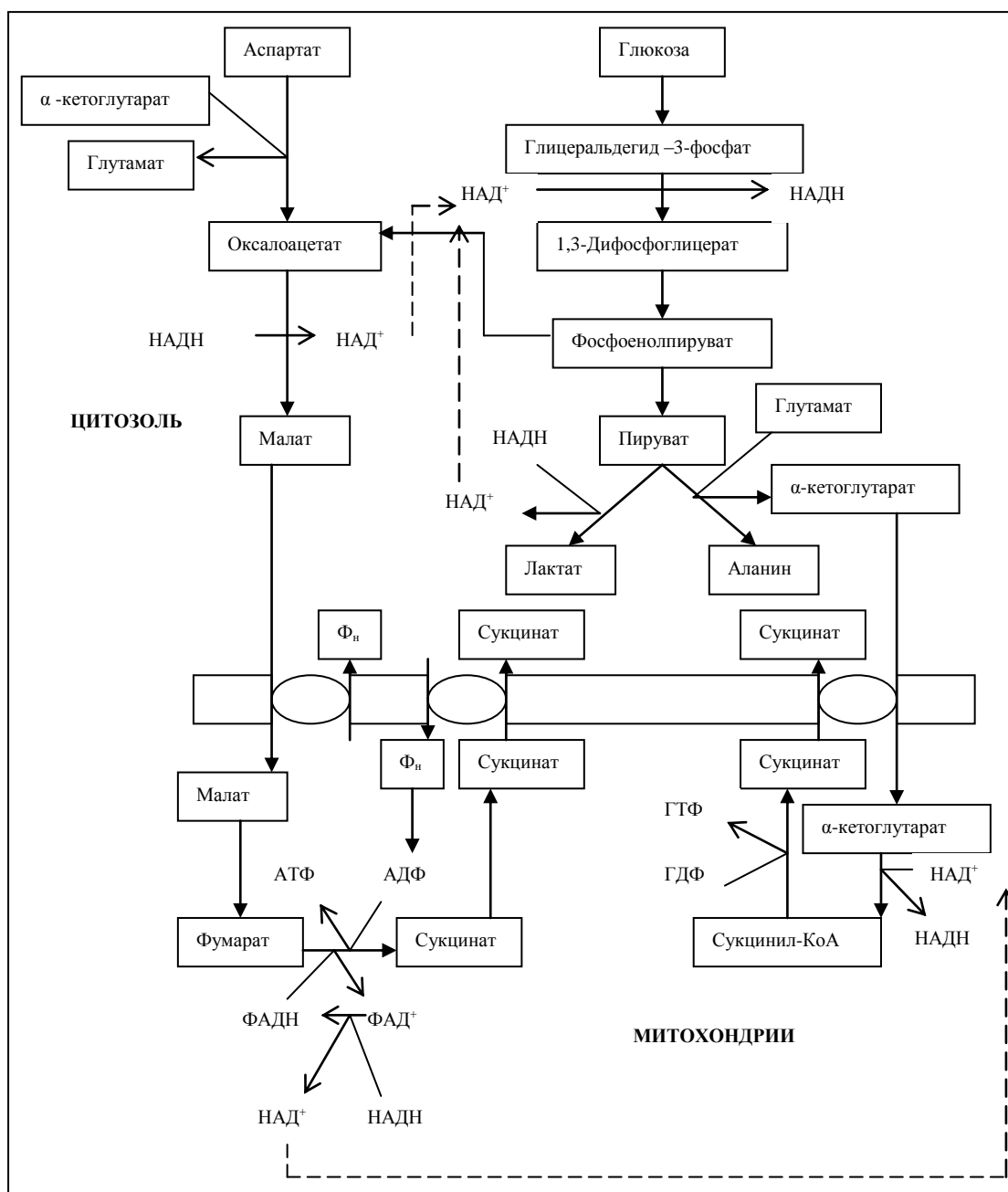


Рис. 4.3. Метаболическая схема использования белков и углеводов митохондриями мышц в условиях анаэробноза [Owen, 1974]

4.2.3. Характеристики белкового обмена

Максимальный уровень белка и аминокислот у *M. galloprovincialis* и *A. inaequalis* отмечали в гепатопанкреасе. В остальных тканях содержание этих соединений было существенно ниже: минимум у *A. inaequalis* наблюдали в ноге, а у *M. galloprovincialis* – в жабрах (табл. 4.2) [Солдатов и др., 2009].

Таблица 4.2

Сравнительная оценка содержания белка и его метаболитов в тканях *M. galloprovincialis* и *A. inaequalvis*

Показатели	Виды тканей и моллюсков					
	Гепатопанкреас		Жабры		Нога	
	Мидия	Анадара	Мидия	Анадара	Мидия	Анадара
Белок, мкг мг ⁻¹	102,5±5,0 (20)	102,5±2,0 (20)	20,6±0,7 (20)	59,4±2,0 (20)	41,5±1,7 (20)	31,9±1,0 (20)
Аминок-ты, мкг мг ⁻¹	0,21±0,01 (20)	0,60±0,02 (20)	0,07±0,002 (20)	0,38±0,01 (20)	0,18±0,01 (20)	0,10±0,003 (20)
Мочевина, нмоль мг ⁻¹	1,32±0,04 (10)	35,6±3,4 (10)	0,38±0,06 (10)	7,81±1,1 (10)	2,16±0,18 (10)	2,65±0,43 (10)

Примечание: в скобках указано число особей

В сравнении с *M. galloprovincialis* для тканей *A. inaequalvis* было характерно высокое содержание свободных аминокислот, особенно на уровне жабр и гепатопанкреаса (табл. 4.2) [Солдатов и др., 2009]. Различия составляли 2,8-5,4 раза ($p < 0,001$). Индекс аминокислоты/белок превышал значения, отмеченные для *M. galloprovincialis* в 1,9-2,8 раза ($p < 0,001$) (табл. 4.3), а уровень мочевины в 20-27 раз ($p < 0,001$). Все это свидетельствовало об активном белковом катаболизме в указанных тканевых структурах. В отношении тканевого содержания белка результаты были не столь однозначны. В гепатопанкреасе они фактически совпали, тогда как в жабрах уровень белка у *A. inaequalvis* был почти в 3 раза выше ($p < 0,001$).

Таблица 4.3

Сравнительная оценка величин ряда индексов белкового метаболизма для тканей *M. galloprovincialis* и *A. inaequalvis*

Индексы и ткани	n	Виды моллюсков	
		Мидия	Анадара
Аминокислоты/Белок			
Гепатопанкреас	10	0,0021±0,0001	0,0059±0,0003
Жабры	10	0,0034±0,0001	0,0065±0,0003
Нога	10	0,0045±0,0002	0,0032±0,0001
АсАТ/АлАТ			
Гепатопанкреас	10	0,522±0,004	0,526±0,010
Жабры	10	0,695±0,008	0,499±0,006
Нога	10	0,527±0,004	0,516±0,009

Примечание: n – число особей

Содержание белковых субстратов и метаболитов в ноге моллюсков было иным: уровень мочевины фактически совпадал у обоих видов, а содержание свободных аминокислот и белка у *A. inaequalvis* было соответственно на 45,3 и 23,1 % ниже ($p < 0,001$). Это же нашло отражение и в значениях индекса аминокислоты/белок. В отличие от других тканей, в ноге *A. inaequalvis* они были на 28,9 % ниже ($p < 0,001$), чем у *M. galloprovincialis*.

Распределение активностей АлАТ и АсАТ по тканям обоих видов моллюсков почти не имело тканевой специфики. Активности были близкими (рис.

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

4.4). Исключение составила активность АсАТ в жабрах *M. galloprovincialis*. Она была на 20-25 % выше, чем в ноге и гепатопанкреасе ($p < 0,001$) [Солдатов и др., 2009].

Межвидовое сравнение позволило обнаружить более высокую активность АлАТ в ноге и жабрах *A. inaequalvis* (рис. 4.4). Активность данного фермента на 8,8-11,2 % ($p < 0,001$) превышала значения, отмеченные для *M. galloprovincialis*. Для гепатопанкреаса различия не были статистически выражены [Солдатов и др., 2009].

В случае с активностями АсАТ результаты были не столь однозначны [Солдатов и др., 2009]. В ноге активность АсАТ у *A. inaequalvis* также была более высокой (различия – 8,3 %; $p < 0,01$), тогда как для жабр картина была обратной. У *A. inaequalvis* АсАТ была на 21,6 % ($p < 0,001$), менее активна, чем у *M. galloprovincialis*. В гепатопанкреасе, как и в случае с АлАТ, различия не выявлялись.

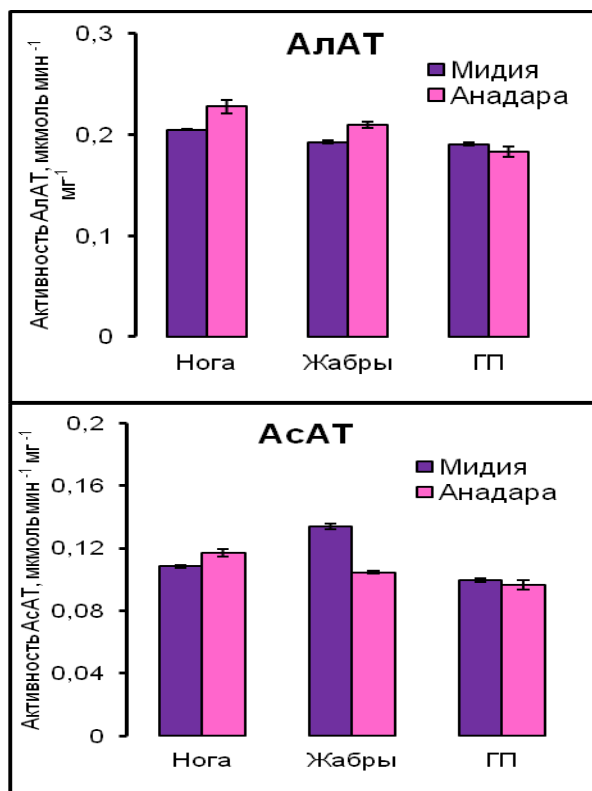


Рис. 4.4. Сравнительная оценка активностей АсАТ и АлАТ в тканях *M. galloprovincialis* и *A. inaequalvis*

Индекс АсАТ/АлАТ в отношении ноги и гепатопанкреаса совпадал у обоих видов и находился на уровне 0,515-0,530 (табл. 4.3). В жабрах картина была иной. У *M. galloprovincialis* значения индекса были максимальны как по отношению к другим тканям моллюска, так и по отношению к *A. inaequalvis*. В последнем случае он был на 28,2 % выше ($p < 0,001$).

Максимальная активность γ -ГТП отмечалась в гепатопанкреасе моллюсков, а минимальная – в ноге (рис. 4.5) [Солдатов и др., 2009]. При этом в тканях *M.*

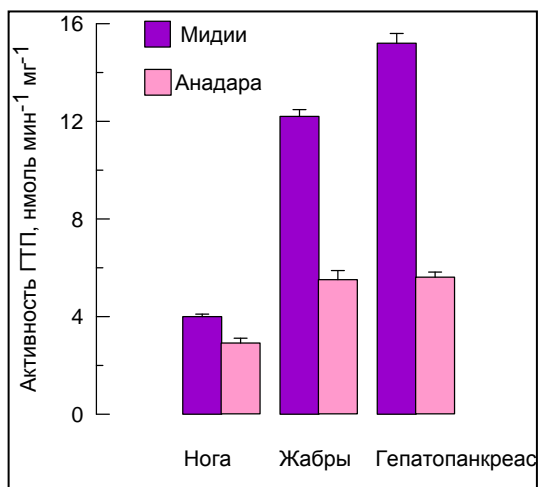


Рис. 4.5. Сравнительная оценка активностей γ -ГТП в тканях *M. galloprovincialis* и *A. inaequalvis*

наоборот, максимум активности приходился на жабры, а минимум – на гепатопанкреас. Сравнительная оценка фактических величин активности позволяет констатировать, что в ноге и гепатопанкреасе у *M. galloprovincialis* она была на 35,5-40,3 % выше ($p < 0,05$), тогда как в жабрах *A. inaequalvis* активность катепсина в 2,6 раза ($p < 0,001$) превышала значения, отмеченные для *M. galloprovincialis*.

Сравнительная оценка содержания белковых субстратов, метаболитов и активностей группы сопряженных с ними ферментов, позволяет выделить ряд принципиальных отличий между изучаемыми моллюсками. Они сводятся к следующим.

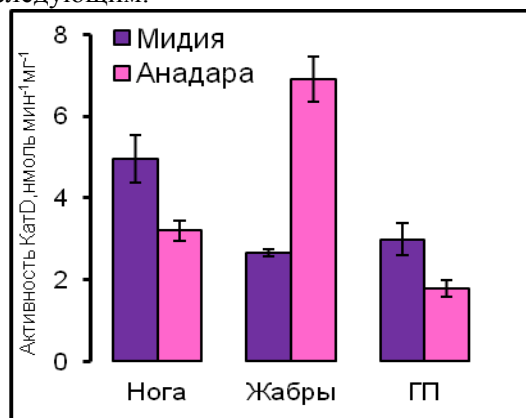


Рис. 4.6. Сравнительная оценка активностей катепсина D в тканях *M. galloprovincialis* и *A. inaequalvis*

Как видно, отличительной чертой тканей *A. inaequalvis* явился повышенный пул свободных аминокислот при чрезвычайно высоком содержании мочевины и сопоставимом с *M. galloprovincialis* уровне белка. Все это отражает более интенсивный уровень белкового катаболизма, который протекает в тканях *A.*

galloprovincialis она была существенно выше, чем у *A. inaequalvis*. Это особенно было заметно в отношении жабр и гепатопанкреаса. Различия между моллюсками по этим тканям составляли 2,2-2,7 раза ($p < 0,001$). В отношении ноги они были не столь выражены – 27,5 % ($p < 0,001$).

Тканевая специфика распределения активности катепсина D не совпадала у исследуемых моллюсков [Солдатов и др., 2009]. У *M. galloprovincialis* максимум активности обнаруживалась в ноге, а минимум в жабрах (рис. 4.6). У *A. inaequalvis*, наоборот, максимум активности приходился на жабры, а минимум – на гепатопанкреас. Сравнительная оценка фактических величин активности позволяет констатировать, что в ноге и

- Ткани *A. inaequalvis* отличались высоким уровнем аминного азота и мочевины при повышенных значениях индекса аминокислоты/белок. Исключение составила нога моллюска, в которой картина была обратной.
- В ноге и жабрах *A. inaequalvis* отмечены повышенные активности АлАТ, АсАТ при близком с мидиями отношении АсАТ/АлАТ.
- У *M. galloprovincialis* во всех тканях отмечена высокая активность γ -ГТП и повышенная активность катепсина D в ноге и гепатопанкреасе.

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

inaequivalvis. Усиление белкового катаболизма у гидробионтов в условиях гипоксии отмечается в работах многих авторов [Шульман и др., 1993; Shulman et al., 2002; Chew et al., 2005]. При этом активно задействуется ресурс свободных аминокислот, в частности глутамата [Waarde, 1988]. Посредством АлАТ, активность которой в ноге и жабрах *A. inaequivalvis* была повышена, глутамат сопрягается с пируватом и доводится до аланина и α -кетоглутарата, тем самым ограничивается образование токсичного лактата (сукцинаттиокиназная реакция) (рис. 4.3). Ферменты митохондрий переводят α -кетоглутарат в сукцинат. При этом клетка получает дополнительный ресурс ГТФ и НАДН₂. Накопление аланина и сукцината в тканях в условиях гипоксии отмечено для морских и пресноводных рыб, в том числе и моллюсков [Горомосова, Шапиро, 1984]. Однако у *A. inaequivalvis* это наблюдалось в условиях нормального содержания кислорода в воде, что, как и в случае с углеводным обменом, является неожиданным и ранее не описано в работах других авторов.

Следует отметить, что оксалоацетат МДГ может получать и при трансформации аспартата (рис. 4.3). У *A. inaequivalvis* активность АсАТ в ноге была повышена в сравнении *M. galloprovincialis*, что позволяет предположить возможность реализации данного процесса в этом органе.

Высокий уровень аминокислот и мочевины в тканях *A. inaequivalvis* и повышенные значения индекса аминокислоты/белок наблюдались на фоне сравнительно низкой активности γ -ГТП и катепсина D (жабры - исключение). Это означает, что направленный гидролиз белков и пептидов в тканях *A. inaequivalvis*, по-видимому, не происходил. Повышенный пул аминокислот скорее являлся следствием особой организации белкового метаболизма в тканях данного вида, важной стороной которого являются процессы пере- и дезаминирования.

В отличие от гепатопанкреаса и жабр, ориентация белкового метаболизма в ткани ноги *A. inaequivalvis* была иной. Уровень мочевины фактически совпадал с установленным для *M. galloprovincialis*, а содержание свободных аминокислот было на 45,3 % ниже ($p < 0.001$). Это, также как и в подразделе 4.2.2, позволяет говорить о том, что метаболизм в данном органе у *A. inaequivalvis* скорее имел аэробную, а не анаэробную ориентацию.

Подводя итог разделу 4.2, можно заключить, что организация метаболизма в организме *A. inaequivalvis* имела выраженную тканевую специфику. В сравнении с *M. galloprovincialis* в условиях внешней нормоксии в жабрах и гепатопанкреасе моллюска преобладали анаэробные процессы, а в ноге – аэробные. Такая асимметрия метаболизма может быть обусловлена условиями существования и поведения данного вида. Он обитает в придонных слоях воды с ограниченным водообменном, часто зарывается в грунт [Brenko, Legac, 1996], то есть состояние гипоксии для него является скорее нормой, чем исключением. При этом моллюск подвижен и активно перемещается, используя ногу, что требует повышенных затрат энергии в данном органе. Учитывая это, можно констатировать, что отмеченные выше особенности организации тканевого обмена у *A. inaequivalvis* функционально обусловлены и имеют адаптивную направленность. Они сохраняются даже в условиях благоприятного кислородного режима вод.

Анаэробная ориентация метаболизма в большинстве тканей *A. inaequivalvis* в условиях внешней нормоксии и при наличии дополнительной кислородной емкости в гемолимфе (эритроцитарный гемоглобин) [Chiancone et al., 1981; Carpena

et al.,1985; Zwaan et al.,1991] остается до конца не понятной. Известно, что переориентация метаболизма с аэробного пути на анаэробный находится под контролем HIF-1 (hypoxia inducible factor), который экспрессируется гипоксией [Vleugel et al., 2004; Bosworth et al., 2005; Ju et al., 2007]. В частности он контролирует продукцию в клетке ЛДГ [Rees et al., 2001]. Водные организмы также содержат данный фактор. Недавно в условиях экспериментальной гипоксии (5% насыщения воды кислородом) в плазме крови форелей (*Salmo gairdneri*) был идентифицирован белковый фактор по структуре и функциональным характеристикам близкий к HIF-1 млекопитающих [Soitamo, 2001]. Показано, что он способен индуцировать гены, ответственные за гликолитические и эритропоэтические процессы в организме рыб. В условиях нормоксии продукция HIF-1 подавляется [Vleugel et al., 2004; Bosworth et al., 2005; Ju et al., 2007].

Из полученных в настоящей работе данных следует, что, несмотря на нормальное содержание кислорода в воде, в тканях *A. inaequalvis* сохраняются высокие активности ЛДГ и МДГ, то есть анаэробные процессы оказываются не чувствительными к присутствию кислорода. Это означает, что продукция HIF-1 сохраняется в условиях внешней нормоксии, то есть локус HIF-1 утрачивает чувствительность к кислороду. Последнее может быть связано с изменением его структуры в процессе приспособления моллюска к существованию в среде с крайне ограниченным водообменном.

4.3. Пути реорганизации тканевого метаболизма у *A. inaequalvis* в условиях экспериментальной аноксии

Как отмечалось, представители рода *Anadara* отличаются повышенной устойчивостью к гипоксии и аноксии в сравнении с другими систематическими группами типа Mollusca. Их отличает способность поддерживать исходный уровень аэробного метаболизма при чрезвычайно низком насыщении воды кислородом (менее 1,2 % насыщения) [Cortesi et al.,1992], а выживаемость в условиях аноксии достигает 15 суток [Zwaan et al., 2002]. В настоящем разделе представлены результаты экспериментальных исследований, выполненных в отделе физиологии животных и биохимии ИнБЮМ НАН Украины по изучению особенностей реорганизации тканевого метаболизма у *A. inaequalvis* в условиях аноксии [Солдатов и др., 2009; 2010; Андреевко и др., 2009].

4.3.1. Моделирование внешней гипоксии

Осуществляли при помощи специально изготовленного стенда. Стенд состоит из 6 блоков: рабочей камеры, блока аэрации, насоса, ультратермостата, кислородомера и регистрирующего устройства (рис. 4.7).

Рабочая камера. Имеет габаритные размеры 280x340x390 мм. Состоит из двух камер и крышки. Внутренняя камера – рабочий отсек – вместимостью 15 литров имеет входной и выходной патрубки, которые соединены при помощи силиконовых шлангов с насосом и блоком аэрации. Насос обеспечивает непрерывную циркуляцию морской воды во внутренней камере с целью:

- обеспечения нормальной работы кислородного датчика;

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

- поддержания постоянного кислородного режима в рабочей камере.

Внешняя камера, как и внутренняя, выполнена из винипласта и имеет два самостоятельных патрубка, которые соединены с ультратермостатом при помощи силиконовых шлангов. Ультратермостат обеспечивает автоматическое поддержание заданного температурного режима в «рубашке» рабочей камеры посредством циркуляции дистиллированной воды.

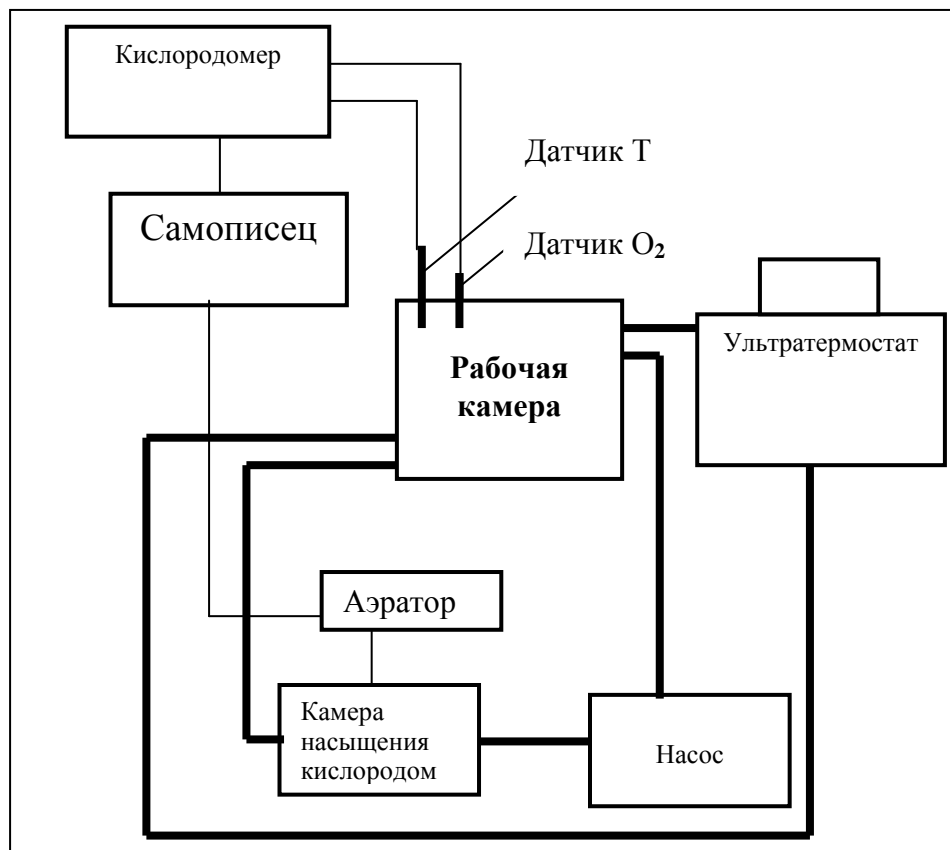


Рис. 4.7. Принципиальная схема экспериментального стенда

Крышка рабочей камеры выполнена из прозрачного оргстекла и при помощи резиновой прокладки герметично крепится к корпусу камеры болтами, изготовленными из нержавеющей стали. В крышке имеются два отверстия для размещения датчиков температуры и кислорода. Они соединены с кислородомером, который в свою очередь подключен к блоку автоматической регистрации (самописец КСП-4).

Блок аэрации. Он включает в себя камеру насыщения кислородом и аэратор. Камера выполнена из винипласта, габаритные размеры 200×200×450 мм, имеет входные и выходные патрубки и отверстие для подключения аэратора. Внутри камеры имеется специальная перегородка, которая позволяет проводить обогащение воды кислородом и одновременно не допускает попадание пузырьков воздуха в рабочую камеру.

Аэратор типа EP 8500 фирмы «Рембо» (Германия) подключается к камере насыщения кислородом через специальное отверстие и насадку. Он осуществляет подачу воздуха к распылителю камеры насыщения. Включение его контролирует самописец.

Насос. Он выполнен из винипласта. Габаритные размеры 200x200x450 мм. Мотор посредством вала и лопастей, находящихся в изолированном отсеке, перекачивает воду в замкнутом пространстве, обеспечивая ток воды в рабочей камере.

Ультратермостат. В работе использован стандартный ультратермостат марки UTU-4 (Польша). Он имеет систему автоматического контроля температуры. Нагрев воды происходит за счет термопары в рабочей камере ультратермостата. Автоматически с термопарой включается насос, который и перекачивает воду в рубашку камеры.

Блок автоматической регистрации. В качестве регистрирующего устройства использован потенциометр марки КСП-4. Он предназначен как для постоянной регистрации параметров (температура, концентрация кислорода), так и автоматического пуска блока аэрации при снижении кислорода ниже установленного уровня.

Кислородомер. В работе использовали кислородомер марки ELWRO N 5221 (Польша) или АК-04 (НПО «Сигма», Россия). Они позволяли регистрировать концентрацию кислорода и температуру в рабочей камере при помощи соответствующих датчиков. Информация с кислородомера передавалась на потенциометр КСП-4.

В рабочую камеру стенда помещали 30 особей анадары. Содержание кислорода в воде снижали в течение 2,5-3,0 часов с 8,5-8,7 до 0 мг л⁻¹ прокачиванием N₂. Температуру воды поддерживали на уровне 20±1°C. Соленость воды составляла 17-18 ‰. Фотопериод – 12 часов день: 12 часов ночь. Экспозиция – 3-е суток. Контрольная группа моллюсков содержалась в аналогичных условиях при концентрации кислорода в воде 8,5-8,7 мг л⁻¹ (95-97 % насыщения). Ежедневно в емкостях с опытными и контрольными животными производили полную смену воды для удаления метаболитов.

4.3.2. Поведенческие реакции

Анализ поведенческих реакций показал, что двигательная активность животных в условиях аноксии полностью подавлялась [Солдатов и др., 2009; Андреенко и др., 2009]. Большую часть времени моллюски находились с широко открытыми створками. Нога выбрасывалась за пределы раковины. Периодически створки закрывались на короткий промежуток времени (20-30 минут). В течение трех суток наблюдений ни одно из животных не погибло. Анализ особенностей течения метаболических процессов в организме анадары показал, что они имеют явно выраженную тканевую специфику.

4.3.3. Особенности углеводного метаболизма

В условиях аноксии направленность изменений тканевого содержания глюкозы, лактата, пирувата и активностей ЛДГ и МДГ совпадала во всех

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

исследуемых органах. Отличия в основном носили количественный характер [Андреевко и др., 2009].

Нога. Данный орган активно используется моллюском при перемещении по дну и зарывании в грунт. В условиях экспериментальной аноксии содержание глюкозы, лактата и пирувата в ноге анадары не изменялось, оставаясь на уровне контрольных значений (табл. 4.4). Имеющиеся различия не были статистически выражены.

Таблица 4.4

Содержание отдельных углеводных метаболитов в тканевых структурах анадары в условиях нормо- и аноксии

Показатели	Виды тканей					
	Нога		Жабры		Гепатопанкреас	
	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия
Глюкоза, нм мг ⁻¹ ткани	1,52±0,48	2,41±0,67	6,31±0,87	4,26±1,54	12,1±1,0	7,25±1,39
Лактат, нм мг ⁻¹ ткани	2,02±0,29	1,50±0,21	5,87±0,93	5,72±1,61	8,30±1,31	7,42±2,23
Пируват, нм мг ⁻¹ ткани	0,75±0,05	1,05±0,16	1,25±0,21	1,83±0,25	1,79±0,31	1,51±0,70

Примечание: объемы выборочных совокупностей – 10 особей

Характер изменения активностей ЛДГ и МДГ представлен на рисунке 4.8. Активность ЛДГ понижалась в 3,6 раза ($p < 0,001$). При этом активность МДГ сохранялась на уровне контрольных значений с некоторой тенденцией на снижение, которая статистически не являлась достоверной. Индекс МДГ/ЛДГ увеличивался более чем в 2 раза ($p < 0,001$).

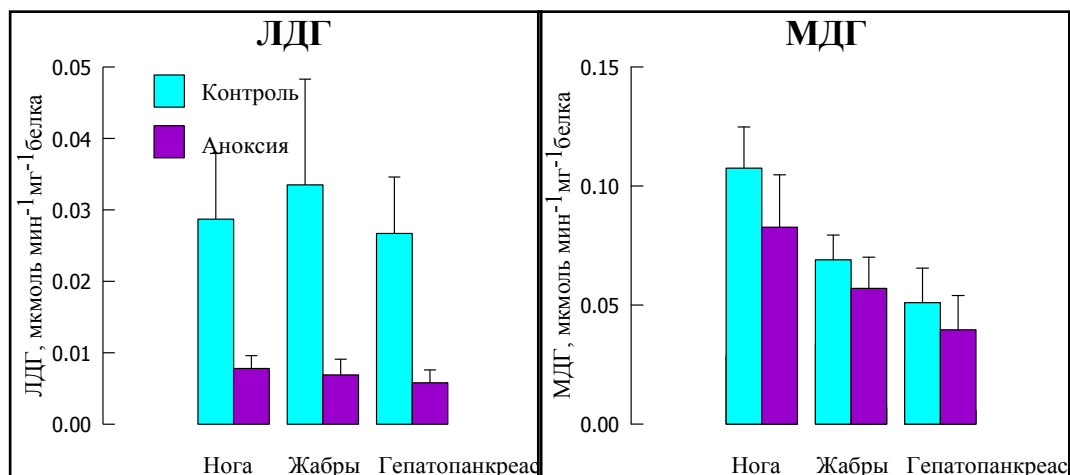


Рис. 4.8. Активности ЛДГ и МДГ в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии

Жабры. Содержание глюкозы в данном органе в течение аноксии понижалось на 32,5 %, а пирувата, напротив, увеличивалось на 46,3 % (табл. 4.4). Однако в виду существенной вариабельности полученных значений различия не

были статистически достоверны. Содержание же лактата в ткани жабр сохранялось на уровне контрольных величин. Это означает, что фактически концентрация углеводных метаболитов в жабрах, как и в случае с ногой моллюска, в условиях экспериментальной аноксии не претерпевает существенных изменений.

Изменение же активностей ЛДГ и МДГ в жабрах анадары полностью совпадает с рассмотренным выше (рис. 4.8). Активность ЛДГ в отсутствие кислорода подавлялась почти в 5 раз ($p < 0,001$), тогда как МДГ была близка к контрольным величинам. В сравнении с контрольной группой моллюсков индекс МДГ/ЛДГ возрастал в 4 раза ($p < 0,001$) [Андреевко и др., 2009].

Гепатопанкреас. Содержание глюкозы в гепатопанкреасе в условиях экспериментальной гипоксии также понижалось (табл. 4.4). Однако, в отличие от жабр, различия были статистически значимы и составляли 40,1 % ($p < 0,05$). При этом уровень лактата и пирувата в данном органе не изменялся. Отличий между контрольной и опытной группами животных выявлено не было.

Характер изменения активностей ЛДГ и МДГ соответствовал описанным для жабр и ноги моллюска (рис. 4.8). Активность ЛДГ в сравнении с контрольной группой снижалась в 4,5 раза ($p < 0,001$). При этом изменение активности МДГ не было статистически выражено. Такая разнонаправленность изменений активностей данных ферментов сопровождалась ростом значений индекса МДГ/ЛДГ в 3,5 раза ($p < 0,001$) [Андреевко и др., 2009].

Таким образом, изменение содержания ряда углеводных метаболитов и активностей ЛДГ и МДГ в условиях экспериментальной аноксии совпадало во всех исследованных тканях анадары и сопровождалось:

- понижением содержания глюкозы на фоне роста вариабельности регистрируемых значений, что затрудняло выявление статистически значимых отличий;
- сохранением тканевого уровня пирувата и лактата, а также значений индекса лактат/пируват;
- многократным снижением активности ЛДГ при отсутствии изменений активности МДГ, что сопровождалось значительным ростом значений индекса МДГ/ЛДГ.

4.3.4. Особенности белкового метаболизма

В отличие от углеводного обмена изменение параметров белкового обмена у особей анадары в условиях экспериментальной аноксии имело тканевую специфику [Солдатов и др., 2009; 2010; Андреевко, 2009; Андреевко и др., 2009].

Нога. В течение 3-х дневной аноксии у моллюсков в ноге отмечали снижение содержания белка на 26,6 % ($p < 0,01$) (табл. 4.5). При этом одновременно происходило увеличение уровня мочевины на 43,7 % ($p < 0,01$). Пул свободных аминокислот в ноге анадары повышался на 35,3 % ($p < 0,001$). Отмеченные изменения позволяют констатировать усиление процессов белкового катаболизма.

Отмеченные выше изменения происходили на фоне роста активностей аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) в ноге моллюска: на 31,0 % и 28,0 % ($p < 0,05$) соответственно (рис. 4.9). Пропорциональное увеличение активности отмечали и в отношении γ -ГТП (рис. 4.9) Рост составил 37,4 % ($p < 0,05$). Незначительное

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

повышение активности отмечали и в отношении катепсина D (рис. 4.10). Однако оно не было статистически выражено.

Таблица 4.5

Содержание отдельных белковых метаболитов в тканях анадары в условиях нормо- и аноксии

Показатели	Виды тканей					
	Нога		Жабры		Гепатопанкреас	
	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия
Белок, мкг мг ⁻¹ ткани	38,7±1,2	28,4±2,4	46,9±4,0	35,9±3,0	143,5±12,5	116,4±3,9
Аминок-ты, мкг мг ⁻¹ ткани (10 ⁻³)	68,5±3,1	92,7±5,0	192,6±13,3	282,3±11,5	285,1±19,5	423,8±37,9
Мочевина, нм мг ⁻¹ ткани	2,68±0,24	3,85±0,31	11,8±4,2	25,0±2,5	28,4±2,3	15,7±3,5

Примечание: объемы выборочных совокупностей – 10 особей

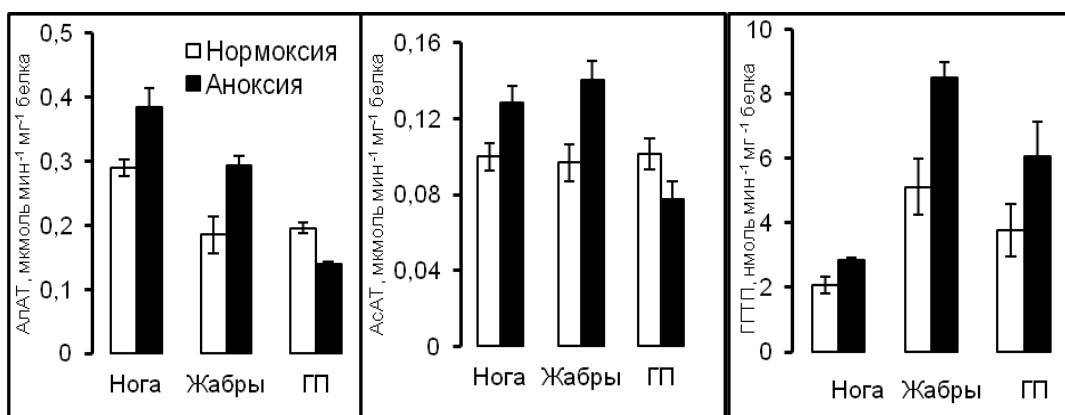


Рис. 4.9. Активности АлАТ, АсАТ и γ -ГТП в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии

Жабры. Реакция жаберной ткани моллюска на условия экспериментальной

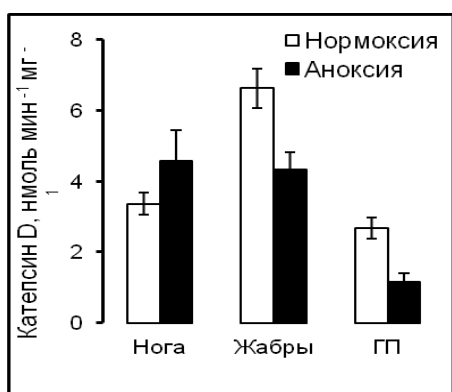


Рис. 4.10. Активность катепсина D в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии

аноксии была близкой к рассмотренной выше. Содержание белка в ней понижалось на 23,5 % ($p < 0,05$) (табл. 4.5). Это происходило на фоне увеличения уровня мочевины и пула свободных аминокислот соответственно в 2,1 раза ($p < 0,05$) и на 46,6 % ($p < 0,001$) [Андреевко, 2009].

В жабрах, также как и в ноге моллюска, в условиях аноксии отмечали рост активностей аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) и γ -ГТП (рис. 4.9). Активности АлАТ и АсАТ повышались соответственно на 58,4 % ($p < 0,01$) и 45,4 % ($p < 0,01$), а γ -ГТП – на 65,9 % ($p < 0,01$). Активность катепсина D, напротив, снижалась на 34,6 % ($p < 0,01$) (рис. 4.10).

Гепатопанкреас. Метаболические процессы, развивающиеся в данном органе в условиях экспериментальной аноксии, имели ряд принципиальных особенностей в сравнении с ногой и жабрами моллюска. Также как и в двух предыдущих случаях в гепатопанкреасе происходило снижение содержания белка на 18,9 % ($p < 0,05$) и повышался пул свободных аминокислот на 48,6 % ($p < 0,01$) (табл. 4.5). Однако это происходило на фоне снижения, а не роста уровня мочевины в органе. Различия в сравнении с контрольной группой составили 44,7 % ($p < 0,01$).

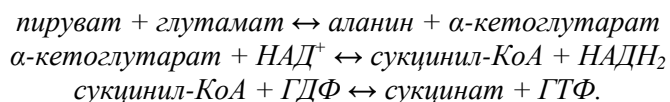
Активности АлАТ и АсАТ в условиях аноксии, в отличие от жабр и ноги, понижались соответственно на 29,1 % ($p < 0,001$) и 24,5 % ($p < 0,05$) (рис. 4.9). При этом активность γ -ГТП увеличивалась на 60,6 % ($p < 0,05$). Снижение активности отмечали и в отношении катепсина D. Оно составило 57,1 % ($p < 0,001$) (рис. 4.10).

Таким образом, аноксия вызвала ряд направленных тканеспецифичных изменений в организме анадары:

- в жабрах и ноге моллюска происходило понижение содержание белка на фоне увеличения пула свободных аминокислот и содержания мочевины;
- изменение содержания белковых метаболитов в ноге и жабрах анадары в условиях экспериментальной аноксии коррелировало с ростом активностей аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) и γ -ГТП; при этом активность катепсина D в этих органах либо не изменялась (нога), либо подавлялась (жабры);
- реакция гепатопанкреаса на отсутствие кислорода имела ряд принципиальных отличий: снижение содержания белка и рост уровня аминного азота в органе происходил на фоне уменьшения, а не увеличения уровня мочевины; при этом активности АлАТ и АсАТ подавлялись; в отношении γ -ГТП и катепсина D изменения совпадали с описанными для ноги и жабр моллюска.

Полученные результаты позволяют констатировать, что в условиях аноксии организм анадары избегал накопления токсичного лактата. Ни в одном из исследованных органов содержание данного соединения не повышалось. При этом активность ЛДГ многократно понижалась, а использование углеводных субстратов явно ограничивалось. Содержание глюкозы в ноге и жабрах моллюска в течение эксперимента не изменялось. Однако это не означает, что гликолитические процессы в этих органах полностью подавлялись. Более вероятным событием является переключение их на образование менее токсичных метаболитов.

Одним из таких путей является сукцинаттиокиназная реакция [Mommensen, 1080]. Она начинается с превращения гликолитического пирувата в аланин с образованием α -кетоглутарата, который в митохондриях окисляется до сукцината с восстановлением ГТФ (рис. 4.3):

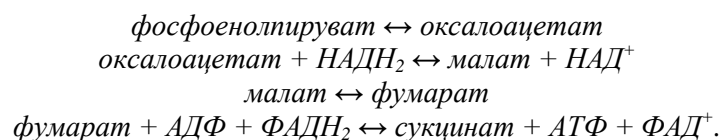


Процесс контролируется АлАТ, активность которой у гидробионтов многократно превосходит известную для наземных позвоночных [Mommensen, 1080]. Рост активности АлАТ в ноге и жабрах анадары, отмеченный в настоящих экспериментах, при отсутствии накопления лактата и снижении активности ЛДГ в тканях позволяет говорить о том, что эта реакция реализуется в органах моллюска в

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

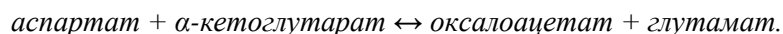
условиях экспериментальной аноксии. Подтверждением этого является также рост активности γ -ГТП. Данный фермент катализирует реакцию отщепления глутаминовой кислоты от пептидов и способен обеспечивать ее транспорт [Кучеренко, 1979]. Из метаболической схемы (рис. 4.3) видно, что нормальное течение сукцинаттиокиназной реакции возможно только при достаточном ресурсе глутамата. Поставку данного соединения и обеспечивает γ -ГТП.

Другой путь может быть связан с использованием ресурсов фосфоенолпирувата. Известно, что цитоплазматическая фракция МДГ сопряжена с гликолитическими процессами через фосфоенолпируваткарбоксикиназу [Skorkowski, 1988], которая трансформирует фосфоенолпируват в оксалоацетат. МДГ восстанавливает оксалоацетат до малата, который затем посредством малат-сукцинатного переносчика направляется в митохондрии и доводится ферментами ветви цикла Кребса до сукцината, при участии митохондриальной МДГ:



Этот процесс описан для ряда гидробионтов и имеет функциональный смысл в условиях экстремальной гипоксии [Шапиро, 1975; Panerucci L. et al., 2000]. Нами отмечалась сохранение повышенной активности МДГ в тканях анадары при подавлении активности ЛДГ, что позволяет предположить возможность реализации этой реакции у моллюска и в условиях внешней аноксии.

Одним из метаболических путей, который может развиваться в тканях гидробионтов в условиях гипоксии, является фумаратредуктазная реакция (рис. 4.3). Она начинается с трансформации аспартата в оксалоацетат под контролем АсАТ с последующим восстановлением до малата. При этом высвобождается глутамат, который может быть использован в сукцинаттиокиназной реакции [Owen, Hochachka, 1974]:



Малат, поступаая в митохондрии, затем превращается в фумарат и восстанавливается до сукцината, о чем говорилось в предыдущем абзаце. Клетка при этом получает одну молекулу АТФ. Эта реакция катализируется МДГ, активность которой, как уже отмечалось, в условиях гипоксии существенно повышается на фоне угнетения ЛДГ.

В настоящих исследованиях зарегистрирован существенный рост активности АсАТ в ноге и жабрах моллюсков. Известно также, что ткани анадары содержат достаточно большой ресурс свободного L- и D-аспартата, которые активно используются в условиях гипоксии [Livingstone, 1991]. Это позволяет рассматривать фумаратредуктазную реакцию как наиболее вероятный метаболический процесс, реализуемый в условиях внешней аноксии у данного вида моллюска.

В условиях экспериментальной аноксии во всех тканях моллюска происходило снижение содержания белка и наблюдалось увеличение уровня

свободных аминокислот и мочевины, что отражает усиление процессов белкового катаболизма. Известно, что гидролиз внутриклеточных белков происходит при участии лизосомальных протеиназ – катепсинов [Немова, 1996]. Активность катепсина D в условиях настоящего эксперимента либо не изменялась (нога), либо претерпевала существенное понижение (жабры, гепатопанкреас). Это происходило на фоне роста активности γ -ГТП. Из этого следует, что в тканях анадары при внешней аноксии гидролизу подвергаются не цельные белки, а олигопептиды с которыми взаимодействует γ -ГТП, освобождая глутамат, используемый в сукцинаттиокиназной реакции.

Особое внимание следует обратить на повышение содержания мочевины в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии. С одной стороны, это отражает усиление процесса дезаминирования аминокислот. С другой стороны, это важно для переориентации метаболизма в тканях на анаэробный путь. Известно, что мочевина подавляет активность ЛДГ, ограничивая тем самым трансформацию пирувата в лактат. В наших экспериментах это действительно имело место. Активность ЛДГ снижалась многократно. Уровень лактата в тканях не повышался. При этом увеличивалась активность ферментов, сопряженных с предшествующими гликолитическими метаболитами: фосфоенолпируватом и пируватом (АлАТ, МДГ).

В сравнении с ногой и жабрами моллюска реакция гепатопанкреаса на условия внешней аноксии имела ряд принципиальных отличий. В данном органе также отмечалось снижение содержания белка и рост уровня свободных аминокислот. Однако это наблюдалось на фоне снижения содержания мочевины, а также падения активностей АлАТ и АсАТ. Это означает, что сукцинаттиокиназная и фумаратредуктазная реакции в данном органе не были реализованы. При этом происходило значительное увеличение активности γ -ГТП. Подобное соотношение процессов позволяет говорить о том, что гепатопанкреас скорее продуцирует определенную смесь аминокислот, нежели использует ее в собственном метаболизме. Данная смесь с током гемолимфы распространяется по организму и утилизируется периферическими тканями моллюска.

Таким образом, в условиях экспериментальной аноксии в организме анадары развивался ряд адаптивных изменений.

- Активность ЛДГ многократно понижалась при сохранении исходной активности МДГ и отсутствии увеличения содержания лактата в тканях.
- В жабрах и ноге анадары усиливались процессы белкового катаболизма, приводящие к снижению содержания белка, росту уровня свободных аминокислот и мочевины. Гидролизу подвергались преимущественно низкомолекулярные пептиды. Об этом свидетельствовало уменьшение активности катепсина D на фоне роста активности γ -ГТП.
- Аноксия сопровождалась усилением сукцинаттиокиназной и фумаратредуктазной реакций, контролируемых АлАТ и АсАТ. Они исключали накопление токсичного лактата в тканях и позволяли получать дополнительный к гликолитическому ресурс макроэргических соединений (АТФ, ГТФ).
- Метаболические процессы в гепатопанкреасе моллюска в отсутствие кислорода были ориентированы на продукцию аминокислот, а не на их утилизацию.

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

4.3.5. Аденилатная система (тканевая специфика)

Максимальный пул адениловых нуклеотидов отмечали в ноге моллюска (табл. 4.6) [Солдатов и др., 2010]. Он был на 43-44 % ($p < 0,001$) выше, чем в жабрах и гепатопанкреасе. Между двумя последними тканями различия не были статистически выражены. Эти же различия сохранялись и в отношении отдельных видов аденилатов.

Таблица 4.6

Содержание адениловых нуклеотидов, неорганического фосфата (Φ_n) и активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в тканях анадары

Показатели	n	Ткани моллюска		
		Нога	Жабры	Гепатопанкреас
Пул аденилатов, мкмоль Γ^{-1}	10	14,6 \pm 0,5	8,17 \pm 0,18	8,21 \pm 0,16
АТФ, мкмоль Γ^{-1}	10	4,91 \pm 0,18	2,97 \pm 0,06	2,94 \pm 0,1
АДФ, мкмоль Γ^{-1}	10	5,83 \pm 0,26	3,10 \pm 0,07	3,05 \pm 0,06
АМФ, мкмоль Γ^{-1}	10	3,84 \pm 0,57	2,10 \pm 0,08	2,22 \pm 0,09
Φ_n , мкмоль Γ^{-1}	10	16,3 \pm 1,5	13,3 \pm 0,8	22,0 \pm 1,4
ЩФ, нмоль $\text{с}^{-1} \text{мг}^{-1}$	10	0,053 \pm 0,007	0,041 \pm 0,006	0,073 \pm 0,009

Примечание: n – число особей

Во всех типах тканей анадары преобладала фракция АДФ. На нее приходилось 37-40 % от общего пула аденилатов. Доля АТФ составляла 33-37 %. Остальное приходилось на фракцию АМФ – 25-27 %. Из этих данных следует, что соотношение отдельных видов адениловых нуклеотидов совпадало во всех типах тканей. При этом абсолютное содержание АТФ, АДФ и АМФ было явно выше в ноге моллюска ($p < 0,001$).

Сравнительная оценка содержания неорганического фосфата (Φ_n) дала обратные результаты. В гепатопанкреасе уровень данного соединения был выше. Различия составляли 35,0 % ($p < 0,001$) и 65,4 % ($p < 0,001$) соответственно по отношению к ноге и жабрам анадары. Это хорошо коррелировало с активностью ЩФ, которая в гепатопанкреасе на 37,7 % и 78,0 % ($p < 0,01$) превышала значения, отмеченные для выше указанных органов.

На основании значений содержания АТФ, АДФ и АМФ в тканях анадары были рассчитаны индексы АТФ/АДФ и АДФ/АМФ (табл.4.7). Они оказались близкими для всех типов тканей моллюска. Различия не были статистически выражены. При этом величина индекса АДФ/АМФ на 29,3-46,9 % ($p < 0,001$) превышала значения, полученные для АТФ/АДФ, что отражало преобладание фракции АДФ по отношению к другим видам аденилатов.

Индекс АМФ/ Φ_n , напротив, был тканеспецифичным (табл. 4.7). Максимальные значения его обнаруживались в ноге моллюска. В жабрах и гепатопанкреасе они были соответственно в 2,4 раза и на 29,2 % ($p < 0,001$) ниже.

Имеющиеся различия определялись, с одной стороны, сравнительно низким содержанием Φ_n в ноге анадары, а с другой стороны, повышенным уровнем АМФ (табл. 4.6).

Таблица 4.7

Соотношение адениловых нуклеотидов, фосфорильный потенциал (ФП) и аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) (заряд Аткинсона) в тканях анадары

Показатели	n	Ткани моллюска		
		Нога	Жабры	Гепатопанкреас
АТФ/АДФ	10	0,85±0,05	0,96±0,01	0,97±0,05
АДФ/АМФ	10	1,60±0,27	1,48±0,04	1,38±0,07
АМФ/ Φ_n	10	0,24±0,03	0,17±0,01	0,10±0,01
ФП	10	0,222±0,009	0,181±0,003	0,118±0,004
АЭЗ	10	0,538±0,019	0,553±0,005	0,544±0,003

Примечание: n – число особей

Близкие соотношения содержания адениловых нуклеотидов в органах анадары определили и сходные значения аденилатного энергетического заряда (АЭЗ) (табл.4.7). Имеющиеся различия не были статистически выражены. Абсолютные значения АЭЗ находились в пределах 0,53-0,56, то есть не превышали 0,75, что отражает умеренную депрессию физиологических процессов в органах моллюска. Вместе с тем, величина фосфорильного потенциала (ФП) имела выраженную тканевую специфику. В ноге анадары значения данного показателя были на 18,5 и 46,8 % ($p < 0,001$) выше, чем в жабрах и гепатопанкреасе соответственно. Это определялось более низким содержанием Φ_n в ноге моллюска (табл. 4.6).

Таким образом, энергетический статус тканей анадары имел ряд особенностей:

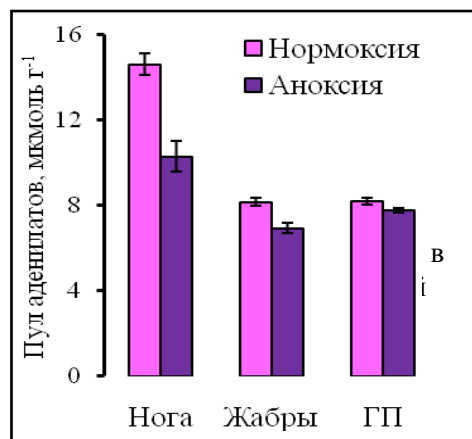
- нога моллюска отличалась самым высоким уровнем адениловых нуклеотидов в сравнении с жабрами и гепатопанкреасом;
- соотношение отдельных видов аденилатов (АТФ, АДФ, АМФ) в тканях было близким;
- в гепатопанкреасе анадары отмечен высокий уровень Φ_n на фоне повышенной активности ЩФ.

4.3.6. Аденилатная система (адаптация к аноксии)

Аноксия вызывала близкие изменения энергетического статуса тканей моллюска, влияя как на пул адениловых нуклеотидов, так и на содержание отдельных их фракций. При этом сохранялась и явно выраженная тканевая специфика, которая и определила характер последовательности изложения полученной информации [Солдатов и др., 2010].

Гепатопанкреас. В условиях аноксии пул адениловых нуклеотидов в данном органе несколько понижался (рис. 4.11). В сравнении с контрольной группой моллюсков снижение составило 5,4 % ($p < 0,05$). Изменения коснулись как фракции АТФ, так и АДФ (рис. 4.12). Уменьшение уровня этих видов аденилатов

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...



составляло 21,4 % ($p < 0,01$) и 14,1 % ($p < 0,05$) соответственно. При этом содержание фракции АМФ, напротив, повышалось на 27,9 % ($p < 0,001$) относительно контрольного уровня.

Соотношение отдельных видов адениловых нуклеотидов в гепатопанкреасе представлено в таблице 4.8. Отношение АТФ/АДФ фактически не изменялось, оставаясь на уровне контрольных значений. Имеющиеся различия (8,2 %) статистически не были выражены. В отношении АДФ/АМФ, напротив, отмечали существенное понижение на 33,3 %

($p < 0,001$). Это, с одной стороны, было связано со снижением содержания фракции АДФ, а с другой стороны, с увеличением уровня АМФ.

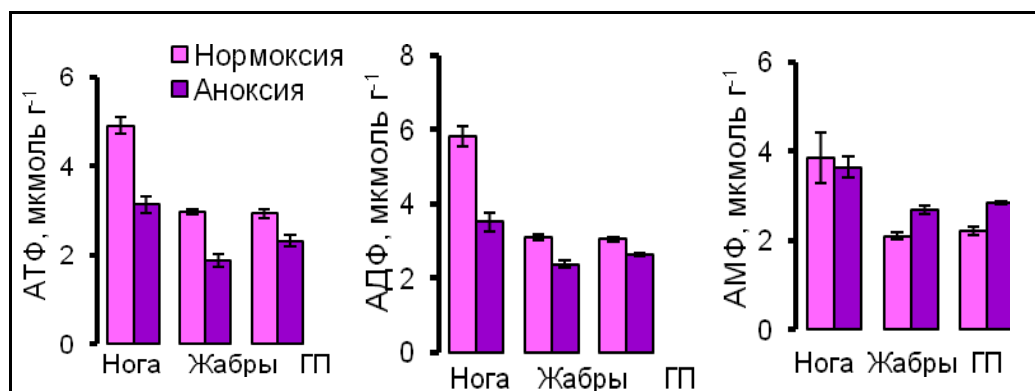


Рис. 4.12. Содержание отдельных видов адениловых нуклеотидов в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии

Таблица 4.8

Соотношение отдельных видов адениловых нуклеотидов в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии

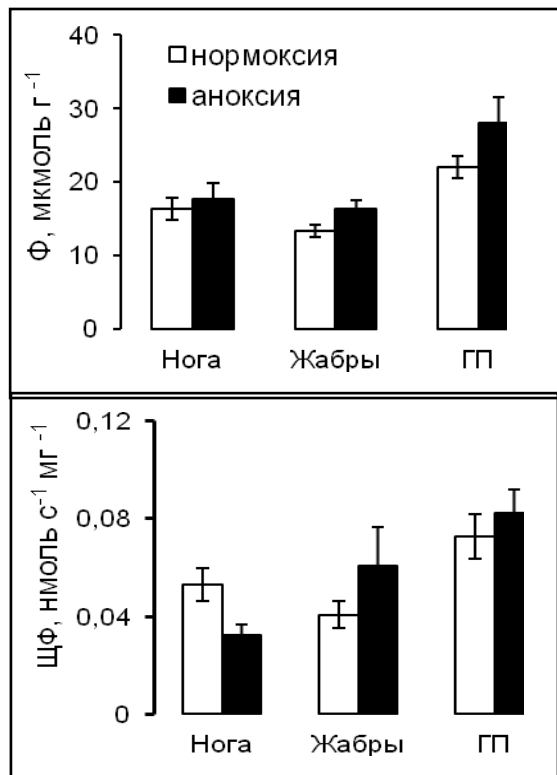
Показатели	n	Ткани моллюска					
		Нога		Жабры		Гепатопанкреас	
		Н	А	Н	А	Н	А
АТФ/АДФ	10	0,85±0,05	0,89±0,01	0,96±0,01	0,78±0,03	0,97±0,05	0,89±0,04
АДФ/АМФ	10	1,60±0,27	0,96±0,01	1,48±0,04	0,89±0,06	1,38±0,07	0,92±0,02
АМФ/Ф _н	10	0,24±0,03	0,21±0,01	0,17±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,17±0,01

Примечание: n – число особей; Н – нормоксия; А - аноксия

Отношение АМФ/Ф_н в условиях аноксии увеличивалось на 70,0 % ($p < 0,001$) (табл. 4.8). Рост был обусловлен преимущественным повышением содержания АМФ в гепатопанкреасе, о чем говорилось выше (рис. 4.12). Увеличение Ф_н было менее выражено и составляло 27,3 %, при этом оно не было статистически значимо

(рис. 4.13). Тенденция роста была отмечена и в отношении ЩФ. Однако в виду достаточно высокой вариабельности полученных значений активности фермента различия также не были статистически достоверны.

Аноксия вызывала существенное понижение значений АЭЗ (рис. 4.14). В сравнении с контрольной группой моллюсков уменьшение значений данного



показателя составило 14,3 % ($p < 0,001$). При этом абсолютные значения АЭЗ оказывались менее 0,5 – $0,466 \pm 0,011$, то есть попадали в зону сублетального угнетения функций.

Фосфорильный потенциал (ФП) гепатопанкреаса также понижался (рис. 4.14). Снижение составило 36,4 % ($p < 0,001$). Уменьшение значений данного показателя было обусловлено преимущественным снижением содержания фракции АТФ (рис. 4.12). Уменьшение уровня АДФ было менее выражено, а изменение Φ_n в ткани гепатопанкреаса вообще не было статистически значимо.

Жабры. Жабры имели соизмеримый с гепатопанкреасом пул аденилатов. В условиях экспериментальной аноксии у анадары отмечали понижение содержания данной группы соединений (рис. 4.11). В сравнении с контрольными животными различия составляли 15,1 % ($p < 0,001$). Это происходило на фоне уменьшения уровня АТФ и АДФ в данном органе соответственно на 37,0 % и 23,2 % ($p < 0,001$) (рис. 4.12). Содержание АМФ, напротив, повышалось. Относительно контрольной группы моллюсков рост составил 28,1 % ($p < 0,001$).

Рис. 4.13. Содержание Φ_n и активность ЩФ в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии

Индекс АТФ/АДФ несколько понижался, что является следствием более значительного изменения уровня АТФ в жабрах (табл. 4.8). Уменьшение составило 18,7 ($p < 0,001$) относительно контрольных данных. Снижение значений индекса АДФ/АМФ было еще более выражено – 39,9 % ($p < 0,001$). Оно определялось не только уменьшением уровня АДФ, но и повышением содержания АМФ. Наиболее существенные изменения претерпевал индекс АМФ/ Φ_n . Его значения были на 41,2 % ($p < 0,001$) ниже, чем у контрольной группы моллюсков.

В жабрах анадары в условиях аноксии отмечалась тенденция роста уровня Φ_n , однако она не была статистически значима (рис. 4.13). Аналогичные изменения были отмечены и в отношении активности ЩФ. В виду значительной

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

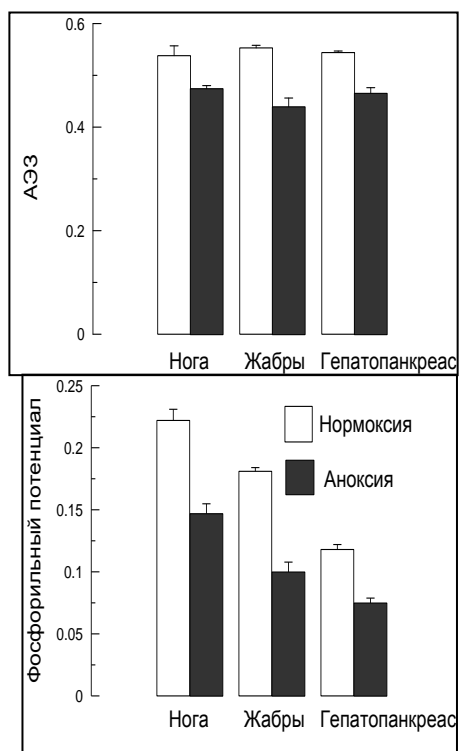


Рис. 4.14. Аденилатный заряд (AЭЗ) и фосфорильный потенциал (ФП) в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии

вариабельности полученных значений различия также не были статистически значимы.

Величина AЭЗ в условиях аноксии понижалась. Снижение было соизмеримо с отмеченным в отношении гепатопанкреаса и составляло 20,4 % ($p < 0,001$) (рис. 4.14). При этом абсолютные значения данного показателя оказывались ниже $0,5 - 0,044 \pm 0,017$, то есть попадали в зону сублетальных величин.

Существенные изменения претерпевал и фосфорильный потенциал (ФП). В условиях отсутствия кислорода в среде его значения понижались на 44,8 % ($p < 0,001$) (рис. 4.14). В сравнении с другими органами это самое существенное понижение ФП. Оно определялось, с одной стороны, более значительным сокращением фракции АТФ в жабрах по отношению к АДФ, а с другой стороны, увеличением содержания Φ_n в данном органе.

Нога. Как уже отмечали, данный орган имел сравнительно высокий пул аденилатов (рис. 4.11). Аноксия оказывала на него наиболее значимое влияние. Суммарный уровень нуклеотидов в ноге моллюска понижался на 29,5 % ($p < 0,001$). Столь же

существенное изменение в органе претерпели фракции АТФ и АДФ. Содержание этих видов аденилатов уменьшалось соответственно на 36,3 % и 39,6 % ($p < 0,001$) (рис. 4.12). Уровень АМФ при этом не претерпевал статистически значимых изменений в сравнении с контрольными величинами.

Пропорциональное уменьшение фракций АТФ и АДФ в условиях аноксии не отразилось на значениях индекса АТФ/АДФ (табл. 4.8). Он сохранялся на уровне контрольных величин. В то же время индекс АДФ/АМФ существенно понижался. В сравнении с контрольной группой моллюсков различия составляли 40,0 % ($p < 0,001$). Это было обусловлено уменьшением содержания фракции АДФ при сохранении уровня АМФ в органе. Значения индекса АМФ/ Φ_n , напротив, были близкими у особей контрольной и опытной групп. Это отражает неизменность уровней АМФ и Φ_n в органе (рис. 4.13).

Сохранение содержания Φ_n в ноге моллюска в условиях аноксии наблюдалось на фоне понижения активности ЩФ (рис. 4.13). В сравнении с контрольной группой активность фермента уменьшалась более чем на 40 % ($p < 0,001$), тогда как в других органах (жабры, гепатопанкреас) была выявлена тенденция роста значений данного показателя.

Величина AЭЗ в отсутствии кислорода в воде также понижалась (рис. 4.14). Изменения были соизмеримы с отмеченными для гепатопанкреаса и жабр

моллюска и составляли 11,7 % ($p < 0,01$). Абсолютные значения АЭЗ, при этом достигали $0,475 \pm 0,001$, то есть они попадали, как в случае с гепатопанкреасом и жабрами, в зону сублетальных величин, так как оказывались менее 0,5 единиц.

Более выраженные изменения в условиях аноксии претерпевал фосфорильный потенциал (ФП) (рис. 4.14). В сравнении с контрольной группой моллюсков величина снижения данного показателя составила 33,8 % ($p < 0,001$). В абсолютных значениях уменьшение значений ФП было еще более существенно. Это обусловлено исходно более высокими значениями ФП в данном органе у контрольной группы моллюсков, о чем говорилось выше.

Таким образом, аноксия негативно влияла на энергетический статус тканей анадары. Это выражалось как в сокращении пула адениловых нуклеотидов, так и в уменьшении содержания высоко энергетических фракций данной группы соединений (АТФ и АДФ). Об этом же свидетельствовали интегральные показатели энергетического обеспечения тканей моллюска: аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) и фосфорильный потенциал (ФП). Значения АЭЗ снижались до уровня сублетальных величин (менее 0,5), а ФП уменьшались на 30-45 %.

Как отмечалось ранее (подраздел 4.3.5), энергетический статус тканей анадары был снижен. Об этом свидетельствуют низкие значения АЭЗ и ФП, являющиеся интегральными характеристиками аденилатной системы. Известно, что величина АЭЗ у большинства тканей и клеток находится в пределах 0,80-0,95 единиц [Страйер 1984]. Так, для других представителей рода *Anadara* были получены значения равные 0,83 [Watanabe et al., 2005].

В нашем случае в условиях нормоксии они не превышали 0,56, что отражает умеренную депрессию физиологических процессов в органах данного вида. Преобладание фракции АДФ среди других видов адениловых нуклеотидов, высокие значения индекса АДФ/АМФ также указывают на низкие энергетические потребности тканей *A. inaequalvis*. Можно рассмотреть несколько причин, определяющих это состояние тканей моллюска.

Способность моллюсков многократно подавлять энергетические потребности тканей, особенно их аэробную составляющую, отмечена во многих работах [Hochachka, 1986; Boutilier et al., 1996; Wu, 2002; Watanabe et al., 2005]. Это отражает крайне низкие значения базального обмена у данной группы организмов и их способность адаптироваться к неблагоприятным условиям среды, в частности к экстремальным формам гипоксии, аноксии, длительному пребыванию на воздухе, значительным градиентам солености и температуры [Hochachka, 1986; Storey, 1988]. Интенсивность обменных процессов при этом может подавляться в 20 и более раз [Larade, Storey, 2007].

Черноморские популяции *A. inaequalvis* в основном приурочены к донным илистым грунтам, а также гипоксическим акваториям северо-западного шельфа Черного моря, то есть к условиям среды с выраженным дефицитом кислорода [Sahin, 2009]. Как показали результаты настоящей работы, у особей данного вида моллюска даже в условиях внешней нормоксии в тканях активно протекают анаэробные процессы. Потребление кислорода крайне незначительно. Такой тип организации метаболизма, по-видимому, и является функциональной основой пониженного энергетического статуса тканей.

Следует также остановиться на тканевой специфике состояния аденилатной системы анадары. Для ноги моллюска был отмечен самый высокий пул адениловых

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

нуклеотидов. Это хорошо согласуется с функциональной активностью данного органа. Моллюск активно использует его при перемещении по субстрату и зарывании в грунт [Ревков и др., 2002]. В подразделе 4.3.3 настоящей работы показано, что уровень аэробных процессов в ноге животного существенно выше, чем в жабрах и гепатопанкреасе, что, по-видимому, и является следствием различий в функциональной активности этих структур.

Необходимо также остановиться и на повышенной активности ЩФ в гепатопанкреасе анадары, так как это сказывается на низких значениях ФП. Данный фермент осуществляет отщепление Φ_n от различных органических соединений в щелочной среде [Солдатов и др., 2009]. Поэтому повышенное содержание Φ_n и низкие значения ФП в гепатопанкреасе моллюска могут определяться минимум двумя процессами:

- гидролизом фосфата от разных форм аденилатов;
- высокой активностью ЩФ.

Как показали результаты настоящей работы, 3-х дневная экспериментальная аноксия оказывала негативное влияние на энергетический статус тканей анадары. Об этом свидетельствует следующая группа фактов:

- снижение уровней АТФ и АДФ;
- уменьшение значений АЭЗ и ФП;
- падение пула аденилатов в целом.

Сведения о влиянии гипоксии и аноксии на энергетический статус тканей моллюсков противоречивы. В некоторых работах отмечается, что гипоксия вызывает существенный (до 70 %) рост содержания АТФ в тканевых структурах пресноводных видов моллюсков и других беспозвоночных (олигохет и хирономид) [Биргер, 1979]. Это связывается со способностью этих систематических групп организмов переходить к крайне низким скоростям суббазального метаболизма, при которых анаэробные метаболические процессы не только обеспечивают потребности тканей в энергии, но и позволяют повышать АЭЗ и ФП тканей в целом.

В ряде работ отмечается, что в условиях острого дефицита кислорода вначале (1-е часы) происходит понижение уровня макроэргов на 30-50 % при одновременном уменьшении АЭЗ до уровня 0,4 единиц. Однако затем данные изменения сохраняются на протяжении многих суток существования в условиях гипоксии (аноксии) [Wijsman, 1976; Shapiro, 1981; Carroll, 1995]. Начальное снижение энергетического статуса тканей связывают либо с развитием компенсационных процессов, направленных на поддержание аэробных процессов, либо с периодом переключения на анаэробные пути метаболизма. По-видимому, именно эта совокупность процессов и реализовалась в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии.

Одним из следствий аноксии являлось снижение пула АДФ в тканях анадары. Данный вид аденилатов является акцептором Φ_n в отличие от АМФ. Поэтому поддержание ресурса АДФ в тканях – необходимое условие быстрого восстановления АТФ. Снижение уровня АДФ может происходить двумя основными путями:

- гидролизом фосфата:



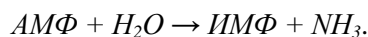
- посредством аденилаткиназной реакции:



Обе реакции необратимы из-за неспособности АМФ связывать Φ_n . Более целесообразной считается аденилаткиназная реакция, так как она позволяет поддерживать ресурс АТФ. Она протекает с относительно постоянной незначительной скоростью [Уотсон, 1978], но может иметь функциональное значение для клетки и тканей в условиях суббазальных скоростей метаболизма, характерных для внешней аноксии. Реакция контролируется миокиназой (аденилаткиназой), активность которой у гидробионтов существенно повышается в условиях дефицита кислорода [Lushchak et al., 1998].

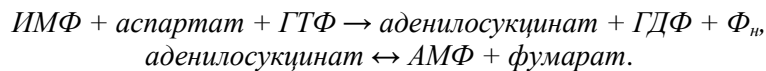
Гидролиз АДФ и аденилаткиназная реакция должны сопровождаться повышением содержания АМФ в тканях. Это действительно имело место в условиях аноксии в жабрах и гепатопанкреасе анадары. Известно, что рост АМФ увеличивает активность фосфофруктокиназы и гликолиза в целом, что важно в условиях анаэробной ориентации метаболизма [Страйер, 1984].

Значительное накопление АМФ в тканях невозможно, так как это соединение не способно выступить в роли акцептора Φ_n и восстановить ресурс АДФ. Оно подвергается дезаминированию с образованием инозиновой кислоты (ИМФ):



Реакция необратима и катализируется АМФ-дезаминазой, чрезвычайно активной в тканях гидробионтов, в частности у рыб [Савина, 1992]. Этот процесс должен сопровождаться снижением пула адениловых нуклеотидов в тканях, что в условиях аноксии и было отмечено в наших экспериментах для анадары, прежде всего в ноге моллюска, где ресурс этих соединений был наиболее высок. В условиях нормоксии содержание АМФ находится в динамическом равновесии с АДФ и АТФ благодаря активностям АТФазы и миокиназы [Савина, 1992]. Острая гипоксия и аноксия нарушают это равновесие, приводя к описанному выше состоянию аденилатной системы клетки.

Следует отметить, что при восстановлении кислородного режима тканей происходит быстрая регенерация пула АМФ и других видов аденилатов [Савина, 1992]. Это происходит в реакциях пуринонуклеотидного цикла (цикл Ловенштейна) за счет ресурса свободных аминокислот, преимущественно аспартата [Савина, 1992]:



Ферменты данного цикла были обнаружены у морских рыб, что не исключает их присутствие и в тканях моллюсков [Савина, 1992].

Таким образом, ткани анадары изначально имеют низкий энергетический статус, что отражает пониженный уровень АТФ и невысокие значения АЭЗ и ФП. Это хорошо коррелирует со сниженными кислородными потребностями данного вида в условиях нормоксии. Аноксия вызывает снижение пула адениловых нуклеотидов и энергетического потенциала тканей в целом. Последнее находит

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

отражение в уменьшении содержания фракций АТФ, АДФ, а также значений АЭЗ и ФП. При этом величина снижения в условиях 3-х суточной аноксии по всем изучаемым показателям не превышает 40-45 %. Это позволяет предположить, что наблюдаемые изменения состояния аденилатной системы тканей моллюска носят сбалансированный характер и являются функционально достаточными для поддержания суббазальных скоростей метаболизма.

4.4. Пути реорганизации тканевого метаболизма у *A. inaequalvis* при голодании

Содержание настоящего раздела фактически вытекает из предыдущего. Как уже отмечалось, двигательная активность особей анадары в условиях аноксии практически не была выражена. Это не исключает и подавление фильтрационной активности, а вместе с этим и потребления питательных субстратов. В связи с этим остается не ясно, является ли отмеченная адаптивная перестройка метаболизма у моллюсков результатом адаптации только к аноксии или в этот процесс вносит существенную корректировку состояние голодания. Для ответа на этот вопрос и была выполнена дополнительная серия экспериментов, результаты которой представлены ниже.

Морскую воду для эксперимента доставляли из 10-мильной зоны и подвергали термической обработке при 80-85°C в течение 4 ч. После этого ее пропускали через мембранный фильтр (Synrog – 2,5) под вакуумом. Экспериментальная часть работы выполнена на специально разработанном стенде (рис. 4.7). Он позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объемом 13,5 л наливали заранее подготовленную воду и помещали 30 особей анадары. Контроль за концентрацией кислорода в воде осуществляли потенциометрически. В течение опыта она не снижалась ниже 7 мг л⁻¹. В работе применяли оксиметр ELWRO N 5123 (Польша). Температуру воды поддерживали на уровне 20±1 °С. Фотопериод – 12 ч день:12 ч ночь. Экспозиция – 18 суток. Пробы тканей отбирали на 1, 6 и 18-е сутки эксперимента. Ежедневно производили полную смену воды в емкости для удаления метаболитов.

4.4.1. Особенности углеводного метаболизма

Изменение активностей ферментов, содержание питательных субстратов и метаболитов у анадары в условиях экспериментального голодания имело выраженную тканевую специфику.

Гепатопанкреас. Содержание глюкозы в данном органе было максимально. В сравнении с жабрами и ногой животного различия составляли 3-7 раз ($p < 0,001$). В течение первых 6-ти суток голодания уровень данного соединения в гепатопанкреасе не изменялся (табл. 4.9). Однако затем он явно понижался. На 18-е сутки голодания в сравнении с контрольной группой снижение составило 40,0 % ($p < 0,01$). Это происходило на фоне уменьшения содержания лактата в ткани на 32,2 %. При этом различия не были статистически выражены в виду существенной вариабельности полученных значений. Уровень пирувата, напротив, в первые 6 суток голодания повышался на 67,3 % ($p < 0,05$), а затем возвращался к исходным величинам – 0,9-1,1 нмоль мг⁻¹.

Таблица 4.9

Содержание глюкозы и ряда углеводных метаболитов в тканях анадары в условиях голодания

Органы моллюска	n	Показатели		
		Глюкоза, нмоль мг ⁻¹	Лактат, нмоль мг ⁻¹	Пируват, нмоль мг ⁻¹
Гепатопанкреас				
Контроль	10	11,4±0,60	10,2±2,05	1,07±0,20
Голодание 6 суток	10	12,1±1,00	8,30±1,31	1,79±0,31
Голодание 18 суток	6	7,21±1,13	6,92±1,13	0,90±0,15
Жабры				
Контроль	10	3,80±0,65	6,73±1,28	0,69±0,09
Голодание 6 суток	10	3,31±0,87	5,87±0,93	1,25±0,21
Голодание 18 суток	6	0,52±0,23	3,79±0,75	1,43±0,26
Нога				
Контроль	10	1,55±0,59	2,86±0,42	3,94±0,11
Голодание 6 суток	10	1,52±0,48	2,02±0,29	0,75±0,05
Голодание 18 суток	6	1,03±0,14	1,85±0,14	1,00±0,07

Примечание: n – число особей

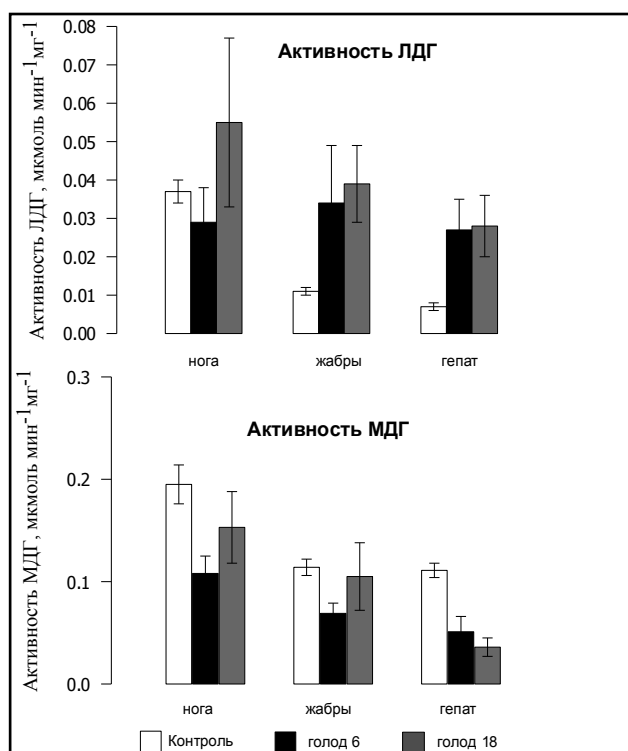


Рис. 4.15. Активности ЛДГ, МДГ в тканях анадары в условиях голодания

Динамика содержания углеводных субстратов и метаболитов в ткани гепатопанкреаса совпадала с выраженными изменениями активностей ЛДГ и МДГ (рис. 4.15). Активность ЛДГ в первые 6 суток эксперимента повышалась почти в 4 раза ($p < 0.05$) и сохранялась в последующем на данном уровне, тогда как активность МДГ устойчиво понижалась на 54-68 % ($p < 0.01$) относительно исходных значений.

Жабры. Динамика изменения уровня углеводных метаболитов на протяжении экспериментального голодания совпадала с отмеченной для гепатопанкреаса, но была более выражена (табл. 4.9). Различие между уровнем глюкозы в ткани жабр в начале и конце опыта (18-е сутки) составило 7,3 раза ($p < 0.001$). Голодание вызывало в жабрах также снижение содержания лактата и рост уровня пирувата соответственно на 43,7 % и в 2,1 раза ($p < 0.05$).

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

Отмеченные изменения происходили на фоне роста активности ЛДГ в 3,0-3,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 4.15). Динамика активности МДГ была более сложной. Вначале она понижалась на 23,1 % ($p < 0,01$), а затем восстанавливалась до исходных значений.

Нога. Голодание также вызывало понижение содержания глюкозы в ноге анадары, как и в других тканях (табл. 4.9). Это происходило на 18-е сутки эксперимента и составило 33,5 %. Этому предшествовало уменьшение уровня лактата и пирувата, которое отмечали на 6-е сутки наблюдений. В сравнении с исходным состоянием различия достигали 35,3 и 74,6 % ($p < 0,001$) соответственно. Динамика изменения активностей ЛДГ и МДГ, как и в отношении жабр и гепатопанкреаса, была разнонаправленной (рис. 4.15). Активность ЛДГ повышалась на 61,8 % (18-е сутки), а МДГ понижалась на 44,6 % ($p < 0,01$) (6-е сутки) с последующим восстановлением до исходного уровня.

Таким образом, в условиях голодания во всех тканях анадары происходили однонаправленные процессы:

- наблюдалось снижение содержания глюкозы и лактата при одновременном росте или отсутствии изменений уровня пирувата;
- активность ЛДГ повышалась, а МДГ понижалась;
- все изменения развивались на 18-е сутки эксперимента; в течение первых 6-ти суток они не были выражены.

4.4.2. Особенности белкового метаболизма

Параметры белкового метаболизма в организме анадары в условиях экспериментального голодания, как и в случае с углеводным обменом, имели тканевую специфику.

Гепатопанкреас. Содержание белка и аминокислот в данном органе было максимально. Уровень этих соединений в 2-6 раз превышал значения, отмеченные для ноги и жабр моллюска ($p < 0,001$). В условиях эксперимента содержание белка в гепатопанкреасе, несмотря на голодание, претерпевало явное увеличение (табл. 4.10). Общий прирост его в течение эксперимента составил почти 40,0 % ($p < 0,01$). Это происходило на фоне уменьшения уровня свободных аминокислот и мочевины в органе соответственно на 41,0 % ($p < 0,01$) и 27,7 % ($p < 0,05$).

Изменение активностей АлАТ и АсАТ было слабо выражено (рис. 4.16). Небольшой рост был выявлен только относительно АсАТ – 17,7 % ($p < 0,05$) на 18-е сутки эксперимента. При этом происходило явное подавление активности γ -ГТП на 33,1 % ($p < 0,05$) (рис. 4.17). Параллельно существенно возрастала активность лизосомальных ферментов. На 18-е сутки эксперимента активность катепсина D была в 3,5 раза выше ($p < 0,01$), чем в начале опыта (рис. 4.18).

Жабры. Изменение содержания белка и его метаболитов в жабрах анадары в ходе экспериментального голодания имело иную динамику в сравнении с гепатопанкреасом. На 6-е сутки эксперимента уровень белка понижался на 21,2 % ($p < 0,01$) и затем не претерпевал статистически значимых изменений (табл. 4.10). Одновременно в органе уменьшалось содержание аминного азота на 48,9 % ($p < 0,001$). Это происходило на фоне тенденции роста уровня мочевины. Активности АлАТ, АсАТ, γ -ГТП и катепсина D в течение опыта не изменялись (рис. 4.16, 4.17, 4.18).

Таблица 4.10

Содержание белка и ряда белковых метаболитов в тканях анадара в условиях голодания

Органы моллюска	n	Показатели		
		Белок, мкг мг ⁻¹	Аминокислоты, мкг мг ⁻¹	Мочевина, нмоль мг ⁻¹
Гепатопанкреас				
Контроль	20	102,5±2,0	0,598±0,024	35,6±3,4
Голодание 6 суток	10	143,5±12,5	0,285±0,020	28,4±2,3
Голодание 18 суток	8	142,7±9,8	0,353±0,065	26,1±4,0
Жабры				
Контроль	20	59,5±2,0	0,378±0,014	7,81±1,12
Голодание 6 суток	10	46,9±4,0	0,193±0,013	11,8±4,15
Голодание 18 суток	8	47,2±2,8	0,199±0,026	10,3±2,89
Нога				
Контроль	20	31,9±1,0	0,102±0,003	2,65±0,43
Голодание 6 суток	10	38,7±1,2	0,068±0,003	2,68±0,24
Голодание 18 суток	8	42,3±0,4	0,089±0,007	2,66±0,47

Примечание: n – число особей

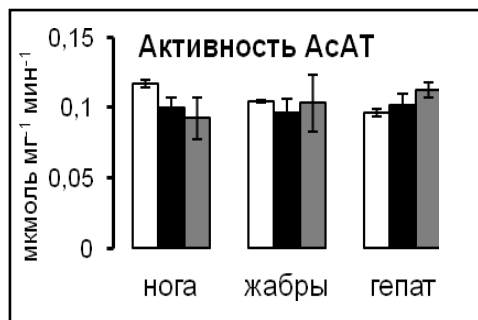
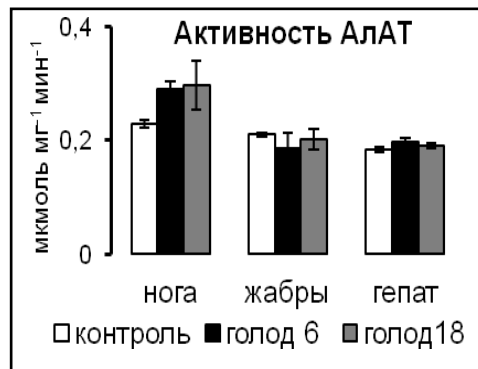


Рис. 4.16. Активности АЛТ, АсАТ в тканях анадара в условиях голодания

Изменение активностей аминотрансфераз (АЛТ и АсАТ) в течение опыта не совпадало (рис. 4.16).

Нога. Уровень белка в ходе экспериментального голодания в ноге анадара повышался на 32,6 % ($p < 0,001$), что совпадало с данными, полученными для гепатопанкреаса (табл. 4.10). Содержание же аминного азота при этом понижалось на 33,4 % ($p < 0,001$), а мочевины не изменялось, оставаясь на уровне исходных величин.

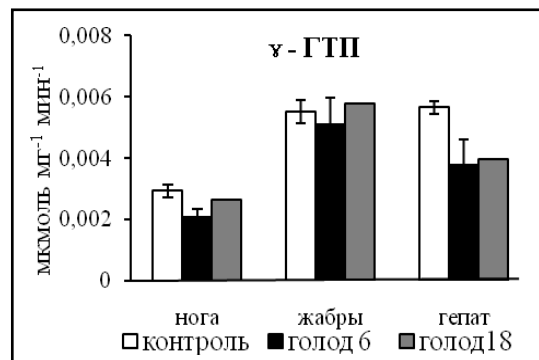
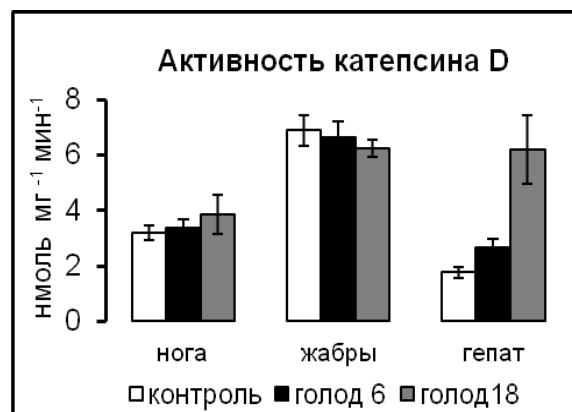


Рис. 4.17. Активность γ-ГТП в тканях анадара в условиях голодания



Специфика тканевого метаболизма у двусторчатого моллюска-вселенца...

Активность АЛАТ повышалась на 27,3 % ($p < 0,001$), а АсАТ, напротив, понижалась на 14,5 % ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными величинами. Эти изменения выявлялись уже на 6-е сутки эксперимента и наблюдались на фоне подавления

активности γ -ГТП. В сравнении с исходным состоянием моллюска на 6-е сутки голодания активность γ -ГТП была на 27,6 % ($p < 0,05$) ниже (рис. 4.17). К концу эксперимента она оказалась близкой к исходному состоянию. В отличие от гепатопанкреаса активность катепсина D в ноге анадары не изменялась на протяжении опыта (рис. 4.18).

Таким образом, экспериментальное голодание вызывало неоднозначное изменение направленности белкового метаболизма в тканевых структурах анадары:

- содержание белка в гепатопанкреасе и ноге моллюска повышалось, тогда как в жабрах, напротив, наблюдали уменьшение значений данного показателя;
- уровень аминокислот снижался во всех изученных тканях;
- содержание мочевины в тканях либо понижалось относительно исходного уровня, либо не претерпевало статистически значимых изменений;
- изменения активностей ферментов также было неоднозначно: активность γ -ГТП подавлялась практически во всех тканях; в гепатопанкреасе наблюдался рост активности АсАТ при существенном повышении активности катепсина D; в ноге происходило увеличение активности АЛАТ; в жабрах изменения активностей ферментов выявлено не было.

Как показали результаты настоящих исследований, во всех образцах тканей анадары голодание вызывало значительный рост активности ЛДГ, это происходило на фоне понижения содержания лактата и роста уровня пирувата. Это совпадает с данными, полученными для *Anabas scandens* (Cuvier) [Vijayaraghavan, Rao, 1986]. Такое соотношение процессов свидетельствует о том, что ЛДГ катализирует преимущественно прямую реакцию окисления лактата в пируват:



Использование же образующегося пирувата тканями в дальнейшем может осуществляться по двум основным путям [Уайт, 1981]:

- реакциям глюконеогенеза с последующим образованием глюкозы и гликогена;
- реакциям окислительного декарбоксилирования – аэробный ресинтез АТФ.

Следует отметить, что активность МДГ во всех исследованных тканях подавлялась. Это означает, что реакции глюконеогенеза были малоэффективны, а ресурс пирувата использовался в направлении реакций окислительного декарбоксилирования. Необходимо отметить, что эти процессы реализовались на начальных этапах голодания, то есть организм моллюска покрывал дефицит питательных субстратов за счет ресурса тканевого лактата. Известно, что анадара в сравнении с другими видами двусторок отличается повышенным тканевым содержанием данного соединения [Солдатов и др., 2008]. Это позволяет ей в отсутствии пищи не использовать продолжительный период времени организменный и тканевой ресурсы углеводов. В настоящих экспериментах понижение содержания уровня глюкозы в тканях анадары отмечали только на 3-ей

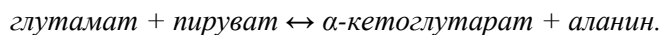
неделе голодания, при этом в гепатопанкреасе и ноге оно не превышало 40 % от контрольного уровня.

Достаточно неожиданным оказался рост содержания белка в ноге и гепатопанкреасе моллюсков в условиях голодания. Опубликованные материалы не дают однозначного ответа по данному вопросу. В ряде работ также отмечается увеличение белковых ресурсов в тканях гидробионтов, но только на начальных этапах голодания [Frolov, Pankov, 1992; Qian et al., 2002]. Это совпадает с настоящими результатами. В большинстве же работ отмечается преобладание процессов белкового катаболизма [Soundarapandian et al., 1997; Shikata, Shimeno, 1997; Guderley et al., 2003; Shoemaker et al., 2003]. Можно допустить, что отмечаемый нами рост содержания белка в условиях голодания скорее носит относительный характер и связан с процессом дегидратации тканей, что отмечается в ряде исследований [Anninsky et al., 2005].

Известно, что стресс-синдром является первой стадией адаптации организма к экстремальным воздействиям, в том числе к отсутствию пищи [Меерсон, 1981]. В ответ на действие стрессорных факторов концентрация в плазме некоторых белков, которые еще называют белками острой фазы, увеличивается и, следовательно, их синтез является составной частью метаболического ответа на стресс [Меерсон, 1981]. Так, некоторые авторы отмечают увеличение количества эритроцитов и содержания гемоглобина в начальный период голодания гидробионтов [Oubella et al., 1993; Borah, Yadav, 1996]. По-видимому, депривация пищи и приводила к развитию подобных процессов в тканях моллюсков, но они реализовались не на всех уровнях. Как уже отмечалось, в жабрах анадары содержание белка несколько понижалось.

Процесс адаптации моллюска к голоданию, по-видимому, шел и по пути активного использования аминокислот как потенциального источника энергии. Такой механизм рассматривается в работе ряда авторов [Kim et al., 1992; Okuma, Watanabe, Abe, 1998]. Содержание аминного азота во всех исследованных органах понижалось. При этом уровень мочевины в тканях не изменялся, а в некоторых случаях уменьшался (гепатопанкреас). Это означает, что снижение тканевого пула аминокислот не было связано с процессами дезаминирования. Донором аминокислот, вероятно, выступает гепатопанкреас, так как только в этом органе отмечался существенный рост активности катепсина D.

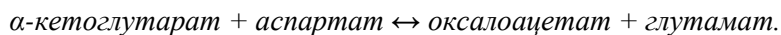
В нашем случае происходил рост активностей АлАТ в ноге и АсАТ в гепатопанкреасе, который наблюдался в первые 6 суток голодания. Известно, что АлАТ катализирует сукцинатиокиназную реакцию:



При этом, по-видимому, реакция протекает в обратном направлении. Необходимо учесть, что реакции, катализируемые трансаминазами, легко обратимы, так как их константы равновесия близки к единице. Об этом свидетельствует также понижение активности γ -ГТП, которая обеспечивает отщепление глутаминовой кислоты от пептидов и способствует тем самым превращению глутамата в α -кетоглутарат. Это означает, что в условиях экспериментального голодания АлАТ, используя ресурс аланина, может поддерживать процессы окислительного декарбосилирования и, как следствие, аэробного ресинтеза АТФ в ткани.

Специфика тканевого метаболизма у двусторчатого моллюска-вселенца...

Рост активности АсАТ также может быть сопряжен с выработкой субстратов, усваиваемых в гликолитических процессах. Данный фермент катализирует реакцию, направленную на продукцию оксалоацетата:



Последний может быть трансформирован в двух направлениях:

- при участии фосфоенолпируваткарбоксикиназы он превращается в фосфоенолпируват и задействуется в гликолитических процессах, а затем в направлении реакций окислительного декарбоксилирования;
- при участии МДГ превращается в малат и затем используется митохондриями.

В настоящих исследованиях активность МДГ подавлялась во всех тканях моллюска. Это означает, что оксалоацетат был задействован преимущественно в гликолитических процессах.

Таким образом, на начальных этапах голодания (6 суток) в тканях анадарты развивается группа реакций, задействующих тканевые ресурсы лактата и аминокислот в процессах окислительного декарбоксилирования. Это отодвигает использование углеводных резервов организма на более поздние этапы голодания. Предполагаемая метаболическая схема рассмотренных выше процессов представлена на рисунке 4.19.

Из схемы видно, что организм моллюска, наряду с глюкозой, использует ряд дополнительных тканевых субстратов на поддержание процессов энергетического обмена в условиях экспериментального голодания.

- В течение первых 6-ти суток голодания задействуется тканевой ресурс лактата в направлении пирувата и затем реакций окислительного декарбоксилирования. Об этом свидетельствует значительный рост активности ЛДГ на фоне снижения содержания лактата и повышения уровня пирувата в тканях.
- Позже (18-е сутки) наблюдается повышение активности АлАТ в направлении трансформации аланина в пируват, что также позволяет поддерживать процессы окислительного декарбоксилирования. Доказательством того, что реакция реализуется именно в этом направлении, является понижение активности γ -ГТП.
- Рост активности АсАТ на фоне понижения активности МДГ позволяет говорить также об использовании тканевого ресурса аспартата в направлении оксалоацетата, а затем фосфоенолпирувата, что также может дополнять поток субстратов в направлении реакций окислительного декарбоксилирования.

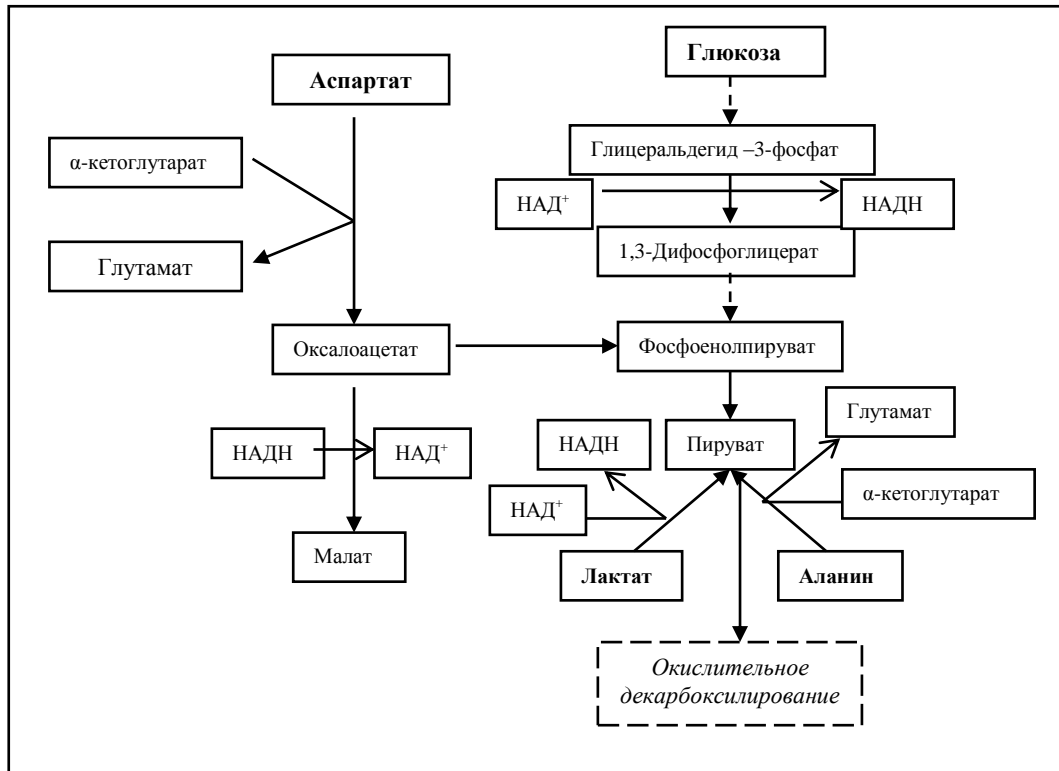


Рис. 4.19. Предполагаемая метаболическая схема процессов, реализуемых в тканях *Anadara inaequalis* Br. в условиях голодания

Как уже отмечалось, выполнение настоящих экспериментов отчасти было необходимо для сопоставления метаболических сдвигов в тканях анадары в условиях экспериментальной аноксии и голодания. Сравнительная оценка особенностей реорганизации тканевого метаболизма при данных состояниях представлена в таблице 4.11.

Из таблицы видно, что динамика содержания субстратов (глюкоза, белок, аминокислоты), метаболитов (лактат, пируват, мочевины) и активностей ферментов (ЛДГ, МДГ, АлАТ, АсАТ, γ -ГТП, катепсин D) во многих случаях была разнонаправленной. Совпадение наблюдали крайне редко. Они отмечались в следующих случаях:

- гепатопанкреас (уменьшение содержания глюкозы и мочевины);
- жабры (уменьшение содержания белка);
- нога (увеличение активности АлАТ, отсутствие изменений активности катепсина D).

Следует отметить, что совпадение динамики изменения содержания отдельных субстратов и метаболитов, активностей ферментов в условиях аноксии и голодания у анадары происходило на фоне отсутствия однонаправленности изменений других функционально связанных с ними показателей. Это означает, что стоящие за ними процессы качественно отличаются друг от друга, протекают самостоятельно и не оказывают существенного взаимного влияния.

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

Таблица 4.11

Сравнительная оценка особенностей реорганизации тканевого метаболизма у анадары в условиях экспериментальной аноксии и голода

Показатели	Виды тканей и условия эксперимента					
	Гепатопанкреас		Жабры		Нога	
	Аноксия	Голод	Аноксия	Голод	Аноксия	Голод
Глюкоза	–	–	±	–	±	–
Лактат	±	–	±	–	±	–
Пируват	±	+	±	+	±	–
ЛДГ	–	+	–	+	–	+
МДГ	±	–	±	–	±	–
Белок	–	+	–	–	–	+
Аминокислоты	+	–	+	–	+	–
Мочевина	–	–	+	±	+	±
АлАТ	–	±	+	±	+	+
АсАТ	–	+	+	±	+	–
γ-ГТП	+	–	+	±	+	–
Катепсин D	–	+	–	±	±	±

Примечание: «+» – увеличение содержания (активности); «–» – уменьшение содержания (активности); «±» – отсутствие изменений

Необходимо также подчеркнуть, что процессы, стоящие за реорганизацией тканевого метаболизма в условиях аноксии и голодания, не совпадают во временном масштабе. В условиях аноксии они были зарегистрированы в течение первых 3-х суток от начала эксперимента, тогда как при голодании выявлялись только на 18-е сутки.

Вышесказанное позволяет заключить, что реорганизация тканевого метаболизма у анадары в условиях экспериментального голодания и аноксии – это самостоятельные, никак не связанные между собой процессы.

4.5. Особенности организации тканевого метаболизма у *A. inaequivalvis* (заключительные аспекты)

Сравнительная оценка величин SLC_{50} (sublethal oxygen concentration), LC_{50} (lethal oxygen concentration) и LT_{50} (lethal time) позволяет констатировать, что *A. inaequivalvis* является одним из самых толерантных к условиям внешней гипоксии и аноксии видом [Vaquer-Sunyer, Duarte, 2008]. Несмотря на относительно большое число работ, посвященных этому моллюску, в настоящих исследованиях был выявлен ряд новых закономерностей, которые расширяют представление, прежде всего, о биоэнергетических аспектах жизни гидробионтов в аноксических условиях водной (морской) среды. Ниже приводится заключительный анализ полученной информации.

4.5.1. Метаболизм в условиях нормоксии

Как отмечалось выше, адаптация к экстремальным формам гипоксии и аноксии сопряжена с угнетением метаболических процессов в организме

Глава 4

моллюсков [Мильман и др., 1974; Камышников, 2004]. В условиях же нормоксии в тканях моллюсков доминируют окислительные процессы. Межвидовое сравнение, проведенное в разделе 4.2, позволило выявить особенности метаболизма *A. inaequalvis*, которые не были отмечены ранее в публикациях других авторов. Интенсивность потребления кислорода при сходных условиях среды (моллюски были собраны одновременно с одних и тех же коллекторов) у *A. inaequalvis* оказалась в 7 раз ниже, чем у *M. galloprovincialis* (анадара – $0,040 \pm 0,014$ мг O_2 экз⁻¹ час⁻¹; мидия – $0,284 \pm 0,065$ мг O_2 экз⁻¹ час⁻¹; при близком весе тела). Следует отметить, что *M. galloprovincialis* также является толерантным к гипоксии видом, о чем свидетельствуют публикации многих авторов [Меерсон, 1981; Уайт и др., 1981; Borah, Yadav, 1996; Солдатов и др., 2008]. Это позволило предположить, что в тканях анадары в условиях нормоксии должны преобладать анаэробные процессы. Анализ содержания ряда метаболитов в тканях и определение активностей группы ферментов позволил подтвердить данное предположение.

Результаты сравнительной оценки ряда показателей углеводного и белкового обмена представлены в таблице 4.12. Из таблицы видно, что активности МДГ и ЛДГ у *A. inaequalvis* многократно превышают активности, отмеченные для *M. galloprovincialis*. Это наблюдается на фоне высоких концентраций лактата и низкого содержания глюкозы в тканях. Такое соотношение процессов возможно только при высокой интенсивности анаэробных процессов, в которых непосредственное участие принимают МДГ и ЛДГ. В виду низкой эффективности процессов анаэробного гликолиза для них характерен также повышенный расход глюкозы и накопление недоокисленных продуктов, например лактата, что в действительности и имело место. Следует обратить внимание также на высокий уровень свободных аминокислот, которые также принимают участие в анаэробных процессах ресинтеза макроэргов, повышая их эффективность [Carefoot et al., 1992; Bowen et al., 2005]. Необходимо также учесть повышенный уровень D-аспартата, характерный для *A. inaequalvis* [Comoglio et al. 2004], который может быть задействован при дефиците кислорода.

Таблица 4.12

Сравнительная оценка параметров углеводного и белкового обмена в тканях анадары и мидии (жабры, гепатопанкреас)

Показатели	Сравнение «мидия-анадара»
Активность МДГ	5-6 раз выше у анадары
Активность ЛДГ	2-4 раза выше у анадары
Содержание глюкозы	2-4 раза ниже у анадары
Содержание лактата	1,5-2,4 раза выше у анадары
Содержание аминокислот	2,8-5,4 раза выше у анадары

Высокую эффективность анаэробных процессов в организме *A. inaequalvis* в условиях внешней нормоксии пока трудно объяснить. Это может быть обусловлено низкой эффективностью процессов респирации или циркуляции гемолимфы. Однако, принимая во внимание наличие дополнительной кислородной емкости гемолимфы у данного вида (эритроцитарный гемоглобин) [Foster, Moon, 1991; Frolov, Pankov, 1992; Gao et al., 2004], это оказывается маловероятной

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

ситуацией. Более вероятным механизмом, объясняющим данное состояние, является, по-видимому, утрата чувствительности HIF-1 (hypoxia inducible factor) к кислороду, который контролирует продукцию ЛДГ [Gao et al., 2004], что более подробно обсуждалось в разделе 4.2.

Межтканевое сравнение параметров углеводного и белкового метаболизма и ресурсов макроэргов позволило выявить еще одну особенность организации обмена веществ у *A. inaequalvis* в условиях внешней нормоксии (табл. 4.13). Нога моллюска имела самый высокий пул аденилатов и наиболее высокий ресурс АТФ, что отражало функциональную значимость данного органа. Известно, что *A. inaequalvis* активно использует ногу для рытья и перемещения по грунту [Guderley, 2003]. Здесь отмечен самый высокий уровень каротиноидов [Hall et al., 2006], которые могут быть источником кислорода [Kim et al., 1992]. Это предполагает особую организацию метаболизма в данном органе в сравнении с жабрами и гепатопанкреасом.

Таблица 4.13

Межтканевое сравнение параметров углеводного и белкового обмена у *A. inaequalvis*

Показатели	Сравнение «жабры-гепатопанкреас» → «нога»
Активность МДГ	1,5-2,0 раза выше в ноге
Активность ЛДГ	4,5-5,0 раз выше в ноге
Содержание глюкозы	2,5-7,4 раза ниже в ноге
Содержание лактата	2,4-3,6 раза ниже в ноге
Содержание пирувата	1,8-2,7 раза ниже в ноге
Содержание аминокислот	3,7-5,4 раза ниже в ноге
Пул аденилатов	43,8-44,0 % выше в ноге
Содержание АТФ	39,5-40,1 % выше в ноге

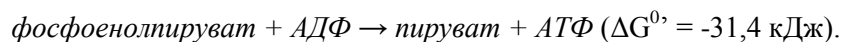
В ноге моллюска была выявлена самая высокая активность ЛДГ на фоне минимального содержания глюкозы, лактата и пирувата в данном органе. Такое соотношение содержания субстратов свидетельствует о том, что ЛДГ катализирует преимущественно прямую реакцию – окисления лактата в пируват:



Образующийся пируват может быть использован в двух направлениях:

- реакциях глюконеогенеза с последующим образованием цитоплазматического оксалоацетата;
- реакциях окислительного декарбоксилирования – аэробный ресинтез АТФ.

Превращение же пирувата в фосфоенолпируват не возможно в виду значительной отрицательной стандартной свободной энергии прямой реакции:



Учитывая значительный ресурс лактата в других тканях (жабры, гепатопанкреас), нога может быть основным потребителем данного субстрата через ток гемолимфы. Какой из процессов: глюконеогенез или окислительное

декарбоксилирование, – реализуется в ноге моллюска, можно сказать только с учетом активности МДГ.

Активность МДГ в ноге *A. inaequalvis* в сравнении с другими тканями была максимальной (табл. 4.13). Известно, что данный фермент сопряжен с ресурсом цитоплазматического оксалоацетата, который может образовываться из фосфоенолпирувата (гликолиз) и ресурса глутамата. Крайне низкий уровень свободных аминокислот в ноге моллюска позволяют предположить последнее, то есть участие глутамата в образовании оксалоацетата. Если это так, то тогда роль МДГ в процессах глюконеогенеза становится несущественной. Это позволяет сделать предположение о дальнейшем превращении пирувата в реакциях окислительного декарбоксилирования, то есть аэробных процессах. Косвенным свидетельством реализации этих процессов в ноге анадара является высокий ресурс аденилатов и АТФ, о чем говорилось выше.

Таким образом, тканевой метаболизм *A. inaequalvis* в условиях внешней нормоксии имеет ряд принципиальных особенностей, отличающих ее от других толерантных к гипоксии видов моллюсков:

- во многих органах (жабры, гепатопанкреас) протекают анаэробные процессы, на фоне крайне низкой интенсивности потребления кислорода организмом;
- аэробный метаболизм, по-видимому, поддерживается только в наиболее функционально значимых для моллюска органах, которые определяют его способность к перемещению по субстрату (нога).

4.5.2. Метаболизм в условиях аноксии

Среди моллюсков *A. inaequalvis* является одним из наиболее устойчивых к экстремальным формам гипоксии и аноксии [Okuma et al., 1998], поэтому она является объектом исследований во многих работах. Даже при крайне низких концентрациях кислорода (менее 1,2 % насыщения) анадара способна поддерживать нормальное потребление кислорода [Foster, Moon, 1991]. По мнению ряда авторов, моллюск также располагает эндогенным ресурсом кислорода, который используется на начальных этапах адаптации к гипоксии [Okuma et al., 1998]. Это связывают с присутствием эритроцитарного гемоглобина, который существенно повышает кислородную емкость гемолимфы [Foster, Moon, 1991; Frolov, Pankov, 1992; Gao et al., 2004]. Не стоит исключать из внимания и значительный ресурс каротиноидов [Hall et al., 2006], особенно в ноге, в которой, предположительно, моллюск поддерживает аэробный метаболизм.

При экстремальных формах гипоксии *A. inaequalvis* способна значительно подавлять аэробные процессы в сравнении с другими моллюсками [Qian et al., 2002] и переключаться на эффективные анаэробные процессы. Обобщая представленную информацию, можно предложить следующую схему реорганизации метаболических процессов в тканях *A. inaequalvis* в условиях экстремальной гипоксии (рис. 4.20). В основу положена схема, рассмотренная ранее (рис. 4.3).

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

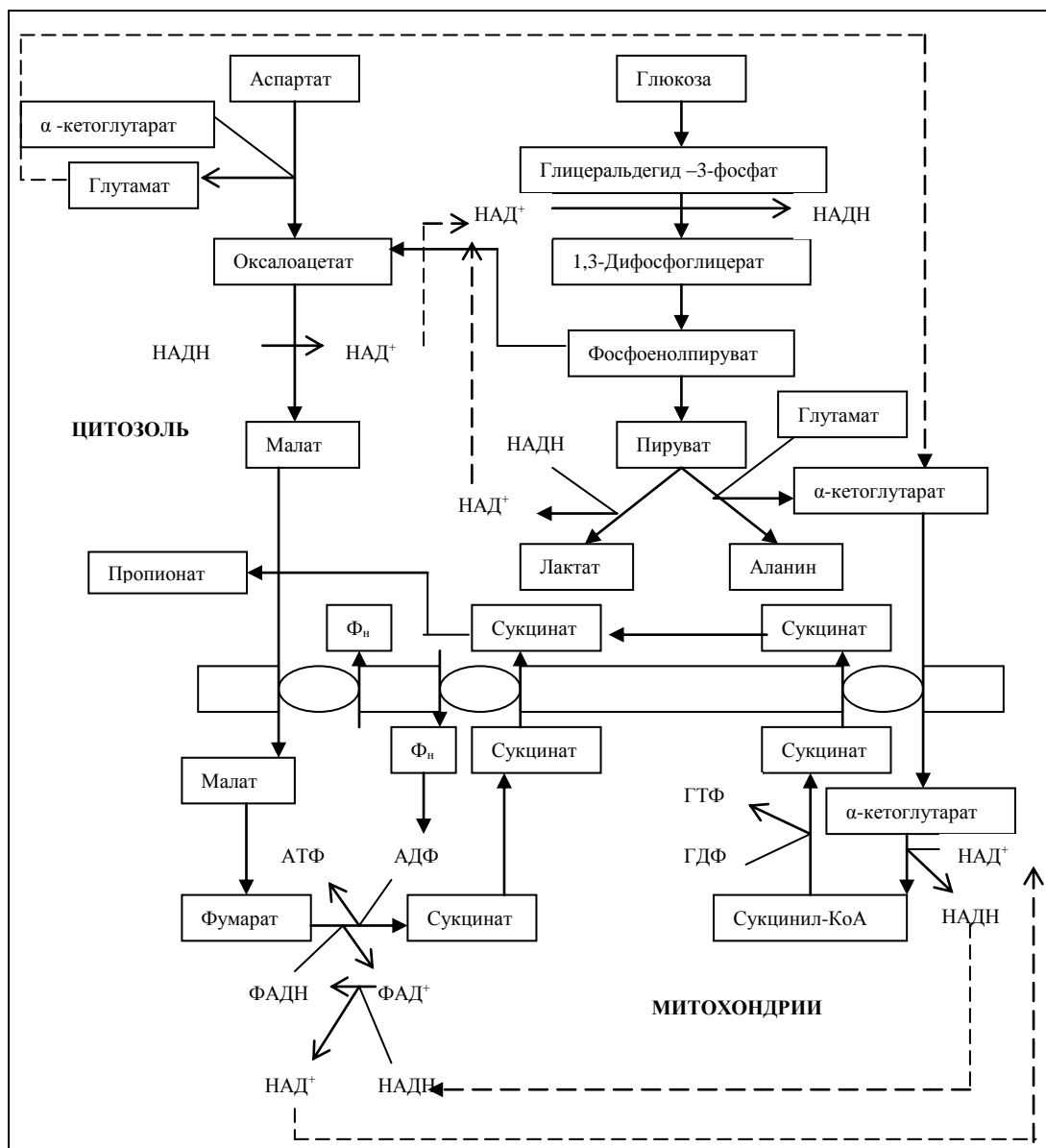


Рис. 4.20. Предполагаемая метаболическая схема, реализуемая в тканях *A. inaequalis* в условиях экстремальной гипоксии

В данную схему, в сравнении с представленной на рисунке 4.3, внесены следующие дополнения:

- показана возможность использования глутамата в реакциях, приводящих к образованию аланина;
- отмечена возможность образования пропионата из сукцината, которая обсуждается во многих работах [Comoglio et al., 2004; Bowen et al., 2005].

Обладая значительными ресурсами D-аспартата, *A. inaequalis* способна поддерживать аспартат-сукцинатное направление метаболизма при ресинтезе макроэргов [Comoglio et al., 2004; Bowen et al., 2005]. Это, в свою очередь,

позволяет трансформировать пируват в аланин, поддерживая тем самым нормальное течение гликолитических процессов [Comoglio et al., 2004; Bowen et al., 2005]. Главными конечными продуктами при этом являются аланин и сукцинат [Comoglio et al., 2004; Bowen et al., 2005]. Последний может трансформироваться в пропионат, повышая энергетический выход анаэробных путей метаболизма *A. inaequalvis* [Comoglio et al., 2004; Bowen et al., 2005]. Из представленной схемы видно, что он может составлять 6 моль АТФ моль⁻¹ глюкозы.

Реализуется ли эта схема в организме моллюска в условиях длительной аноксии остается неясным, так как большинство исследований, выполненных на анадаре, проведено при наличии следов кислорода в воде. Наиболее значимые изменения содержания метаболитов и активностей ферментов, выявленные в тканях *A. inaequalvis* в настоящей работе при аноксии, сведены в таблицу 4.14.

Таблица 4.14

Влияние аноксии на некоторые параметры углеводного и белкового обмена в тканях анадары

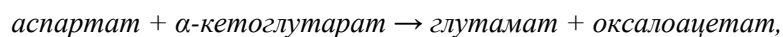
Показатели	Нормоксия → аноксия (жабры, нога)
Активность МДГ	не изменялась
Активность ЛДГ	3,6-5,0 раз снижалась
Содержание глюкозы	не изменялось
Содержание лактата	не изменялось
Активности АлАТ, АсАТ	28-60 % повышались
Активность γ-ГТП	30-65 % повышалась
Содержание белка	26-28 % снижалось
Содержание аминокислот	44-46 % повышалось
Содержание мочевины	1,5-2,0 раза повышалось
Пул аденилатов	15-30 % снижался
Содержание АТФ	35-40 % снижалось

Из полученных результатов следует, что функционирование гликолитической цепи претерпевало качественные изменения. Значительное подавление активности ЛДГ происходило на фоне сохранения содержания в ткани глюкозы, лактата и активности МДГ. Это означает, что терминальные гликолитические метаболиты перераспределялись в иных направлениях.

Сохранение высокой активности МДГ свидетельствует о том, что данный фермент продолжает играть существенную роль в метаболизме тканей моллюска. Известно, что его активность сопряжена с ресурсом цитоплазматического оксалоацетата [Comoglio et al., 2004; Bowen et al., 2005], который может образовываться из фосфоенолпирувата и аспартата (рис. 4.20). Первый процесс маловероятен, так как предполагает потерю АТФ на этапе: фосфоенолпируват → пируват. Второй процесс более вероятен. Он позволяет поддерживать аспартат-сукцинатное направление метаболизма, позволяющее получать дополнительный ресурс макроэргов в условиях анаэробноза. Доказательством реализации его в тканях *A. inaequalvis* является рост активности АсАТ, а также значительные ресурсы D-аспартата, описанные для этого вида [Bowen et al., 2005]. Функционирование же гликолитической цепи, по-видимому, переключается на

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

опинное направление, в частности образование аланина и аланолина (рис. 4.20). Доказательством тому является значительный рост активности АлАТ, отмеченный в ряде тканей моллюска. Это также позволяет получать дополнительный ресурс макроэргов при участии ветви цикла Кребса (сукцинаттиокиназная реакция) за счет образующегося α -кетоглутарата (рис. 4.20). Данное направление метаболизма может поддерживаться за счет ресурса глутамата:



который является побочным продуктом при реализации фумаратредуктазной реакции.

В настоящей работе был зарегистрирован значительный рост активности γ -ГТП. Известно, что данный фермент взаимодействует с олигопептидами, направленно высвобождая глутамат, и может поддерживать тем самым данное направление метаболизма. Все это происходит на фоне снижения тканевого содержания суммарных белков, роста уровня свободных аминокислот и значительного увеличения уровня мочевины, что отражает в целом усиление белкового катаболизма в тканевых структурах моллюска.

Описанная выше схема анаэробной ориентации метаболизма у *A. inaequalvis* в условиях внешней аноксии возможна только при наличии значительных ресурсов аспартата, о чем говорилось выше. Она, по-видимому, обеспечивает достаточный энергетический выход для поддержания процессов жизнедеятельности моллюска. Об этом свидетельствует незначительное снижение пула аденилатов и содержания АТФ в тканях, что отражает эффективность реализуемой адаптационной стратегии.

Однако данная метаболическая схема реализовалась не во всех органах моллюска. Она была характерна для ноги и жабр *A. inaequalvis*. В гепатопанкреасе – ключевом органе метаболизма, процессы имели несколько иную ориентацию. Здесь также отмечали снижение содержания глюкозы, белка, рост уровня свободных аминокислот и повышение активности γ -ГТП. При этом активности АлАТ, АсАТ и содержание мочевины в данном органе в сравнении с группой моллюсков, содержащихся в условиях нормоксии, напротив, понижались. Такое соотношение процессов позволяет рассматривать гепатопанкреас как орган, выполняющий функцию донора аминокислот и моносахаров, которые могут быть использованы в метаболизме периферических тканей. Располагая необходимым комплексом ферментативных систем этот орган в условиях аноксии, по-видимому, продолжает эффективно выполнять функцию координатора потока энергетических субстратов к тканям. Роль посредника при этом выполняет гемолимфа моллюска.

Таким образом, в условиях аноксии в тканях *A. inaequalvis* реализуется группа анаэробных процессов, обеспечивающих эффективный ресинтез макроэргов. Значительную роль начинают играть аминокислоты, ограничивающие использование углеводных субстратов и увеличивающие тем самым продолжительность существования моллюска в среде лишенной кислорода. Метаболизм тканей строится на поддержании фумаратредуктазной и сукцинаттиокиназной реакций. Гепатопанкреас в этих условиях выполняет функцию донора аминокислот и глюкозы.

4.5.3. Метаболизм при голодании

Как уже отмечалось, аноксия и голодание – совмещенные состояния, которые могут оказывать комплексный эффект на организм моллюска. В обоих случаях организм имеет ограниченный резерв энергетических и пластических субстратов, от которого зависит выживание в столь экстремальных условиях. Принципиальное отличие этих состояний – наличие и отсутствие кислорода, что может влиять на выбор адаптационной стратегии.

В настоящей работе была предпринята попытка разграничения эффектов аноксии и голодания на организм *A. inaequalis*. Следует отметить, что для моллюсков-фильтраторов голодание не может быть полным, а только частичным в связи с недополучением тех или иных питательных субстратов. Следует также признать, что информация о состоянии голодания у моллюсков крайне ограничена.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что депривация пищи вызывает у моллюсков принципиально иную реорганизацию метаболизма в тканевых структурах, нежели в условиях внешней аноксии. Об этом свидетельствует информация, о содержании метаболитов и ферментативных активностях, представленная в таблице 4.15.

Наиболее однозначные изменения были отмечены на уровне гликолитических процессов. Они развивались на начальных этапах голодания. Активность ЛДГ значительно повышалась во всех тканях. Это происходило на фоне снижения содержания лактата и глюкозы. Уровень пирувата в тканях, напротив, повышался. Как уже отмечалось, такое соотношение процессов отражает усиление прямой реакции – превращения лактата в пируват. Учитывая, что это происходило на фоне снижения активности МДГ и отсутствия изменения активности АлАТ в большинстве тканей, можно констатировать, что дальнейшая трансформация пирувата происходила в направлении реакций окислительного декарбосилирования.

Таблица 4.15

Влияние голодания на некоторые параметры углеводного и белкового обмена в тканях *A. inaequalis*

Показатели	Питание → голодание
Активность ЛДГ	1,6-4,0 раза повышалась
Активность МДГ	20-70 % снижалась
Содержание глюкозы	1,3-7,0 раз снижалось
Содержание лактата	32-44 % снижалось
Содержание пирувата	1,6-2,1 раз повышалось
Активности АлАТ, АсАТ	изменения незначительны и неоднозначны
Активность катепсина D	3,0-5,0 раз рост в гепатопанкреасе
Активность γ -ГТП	28-33 % снижение
Содержание белка	33-40 % рост (нога, гепатопанкреас); 21% снижение (жабры)
Содержание аминокислот	33-41 % снижение
Содержание мочевины	не изменяется (или незначительно снижается)

Специфика тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца...

Более длительное голодание дополнялось усилением метаболизма аминокислот, ресурс которых во всех тканях существенно понижался. Так, в ноге отмечали повышение активности АлАТ, а в гепатопанкреасе – АсАТ. Рост активности АлАТ происходил на фоне подавления активности γ -ГТП, а АсАТ сочетался со снижением активности МДГ. Это означает, что трансформация аланина и аспартата также происходила в направлении гликолитических метаболитов – пирувата и фосфоенолпирувата, которые подвергаются окислению в реакциях цикла Кребса.

Таким образом, реорганизация метаболизма в органах *A. inaequalvis* в условиях экспериментального голодания сопровождалась усилением процессов аэробного окисления энергетических субстратов (глюкозы, лактата, аминокислот). Учитывая высокую эффективность этих процессов в генерации макроэргов, продолжительность нахождения моллюсков в состоянии голодания может быть существенно увеличена, что, безусловно, имеет адаптивное значение. Следует также отметить, что направленность процессов реорганизации тканевого метаболизма в условиях аноксии и голодания не совпадала. Это означает, что они не взаимно дополняют друг друга, а скорее являются взаимоисключающими.

* * *

Результаты, представленные в настоящей главе, позволяют сделать ряд обобщений.

- Кислородные потребности организма анадарты в условиях нормоксии снижены. В тканях преобладают анаэробные процессы, о чем свидетельствует пониженный уровень глюкозы, увеличенный уровень лактата и высокие активности ЛДГ и МДГ. Это определяет низкий энергетический статус тканей данного вида: сниженный уровень АТФ и невысокие значения АЭЗ и ФП.
- В условиях аноксии в жабрах и ноге животного происходит усиление процессов белкового катаболизма, приводящее к снижению содержания белка, росту уровня свободных аминокислот и мочевины. Гидролизу подвергаются преимущественно низкомолекулярные пептиды. Об этом свидетельствует уменьшение активности катепсина D на фоне роста активности γ -ГТП.
- Аноксия сопровождается ростом значений индекса МДГ/ЛДГ, что связано со снижением активности ЛДГ. Это происходит на фоне усилением сукцинаттиокиназной и фумаратредуктазной реакций, контролируемых АлАТ и АсАТ. Они исключают накопление токсичного лактата в тканях и позволяют получать дополнительный ресурс макроэргов. Метаболические процессы в гепатопанкреасе моллюска ориентированы на продукцию аминокислот.
- Аноксия вызывает снижение пула адениловых нуклеотидов и энергетического потенциала тканей в целом. Это находит отражение в снижении пула аденилатов, уменьшении содержания фракций АТФ, АДФ, а также значений АЭЗ и ФП. Величина снижения не превышает 40-45 %. Изменения носят сбалансированный характер и являются функционально достаточными для поддержания суббазальных скоростей метаболизма, что находит отражение в сохранении жизнеспособности организма в течение 3-х суточной аноксии.
- На начальных этапах голодания (6 суток) анадарты используют ресурс тканевого лактата в направлении реакций окислительного декарбоксилирования. Об этом

Глава 4

свидетельствует значительный рост активности ЛДГ на фоне снижения содержания лактата и повышения уровня пирувата в тканях.

- Процесс адаптации анадары к голоданию идет по пути использования резерва аминокислот. Это отражает уменьшение уровня аминного азота во всех исследованных тканях. Наблюдаемый рост содержания белка в ноге и гепатопанкреасе, по-видимому, носит относительный характер и связан с процессом дегидратации тканевых структур.
- Использование аминокислот как источника энергии тканями анадары в условиях голодания происходит по пути фумаратредуктазной и сукцинаттиокиназной реакций, которые позволяют дополнительно получать гликолитические метаболиты. Об этом свидетельствует рост активности АлАТ и АсАТ в ряде тканей. Донором аминокислот выступает гепатопанкреас, в котором, в отличие от других тканей, недостаток пищи вызывает значительный рост активности катепсина D.

Глава 5

ЭРИТРОИДНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BRUGUIERE, 1789)

Anadara inaequalvis – эврибионтный двустворчатый моллюск-вселенец, успешно осваивающий проблемные акватории Черного и Азовского морей [Анистратенко, Халиман, 2006]. Данный вид способен существовать в широких диапазонах соленостей, температуры, легко переносит экстремальные формы гипоксии и аноксии [Rinaldi, 1985; Nicholson, Morton, 2000]. Считается, что последнее связано с присутствием в гемолимфе моллюска эритроцитарного гемоглобина [Morelloetal., 2004]. Это принципиально отличает анадара от других представителей малакофауны черноморского региона.

Морфологические характеристики эритроидных элементов анадары соответствуют известным для беспозвоночных животных [Glomski, Tamburlin, 1990]. Это ядерные клетки, значительных размеров, имеющие плоский профиль округлой или слабо эллипсоидной формы. При этом их размеры имеют значительные индивидуальные колебания [Ochi, 1969; Fontaine, Hall, 1981; Terwilliger, Terwilliger, 1983]. Помимо ядра эритроциты содержат ряд органоидов: комплекс Гольджи, митохондрии, гранулярный ретикулум, лизосомы, центриоли [Dales, Dixon, 1981; Hayward, 1981]. У них хорошо развит цитоскелет [Joseph-Silverstein, Cohen, 1984; Cohen, Nemhauser, 1985]. В цитоплазме клетки обнаруживается большое количество зернистых базофильных включений, природа которых не вполне ясна [Holdenetal., 1994]. Считается, что эритроциты анадары могут принимать участие не только в транспорте газов (кислорода, диоксида углерода), но и нейтрализации сульфидов [Vismann, 1993].

Функциональная морфология эритроцитов анадары требует учета диффузионной поверхности клетки, ее объема и объема клеточного ядра. Это позволяет оценить удельную поверхность и ядерно-плазматическое отношение и косвенно судить о функциональной активности клеток. К сожалению, эта информация ограничена, что и обусловило предмет настоящих исследований.

Для расчета площади поверхности эритроцита (S_c) использовали уравнение [Houchinetal., 1958]:

$$S_c = 2\pi a^2 b + \frac{2\pi a b \sinh^{-1} e}{e},$$

где

$$a = \frac{C_1 + C_2}{4};$$

C_1, C_2 – большая и малая оси эритроцита, мкм (определяются экспериментально);

$$e = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a}; b = 0,67h;$$

h – толщина эритроцита, мкм:

$$h = 1,8 + 0,0915(C_1 - 7,5) \text{ [Чижевский, 1959].}$$

Объем клетки (V_c) рассчитывали по [Houchinet al., 1958] с модификацией. Так как эритроциты у анадары содержат ядро, то к объему клетки прибавляли эту величину (V_n):

$$V_c = 0,7012h\left(\frac{C_1 + C_2}{2}\right)^2 + V_n.$$

Объем (V_n) и площадь поверхности (S_n) ядра определяли по формулам эллипсоида вращения [Ташкэ, 1980]:

$$V_n = \frac{\pi N_1 N_2^2}{6},$$

$$S_n = 4\pi \sqrt[3]{\frac{2\left(\frac{N_1}{2}\right)^p \left(\frac{N_2}{2}\right)^p + \left(\frac{N_2}{2}\right)^{2p}}{3}},$$

где

$$p = 1.6075;$$

N_1, N_2 – большая и малая оси ядра эритроцита, мкм (определяются экспериментально).

На основании полученных значений объема и площади поверхности эритроцитов и их ядер были определены удельные поверхности данных структур (S_c/V_c и S_n/V_n), а также рассчитано ядерно-плазматическое отношение (V_n/V_c).

Одновременно определяли значения ряда эритроцитарных индексов: среднеклеточное содержание (MCH) и среднеклеточную концентрацию гемоглобина ($MCHC$). Расчеты выполняли по формулам [Золотницкая, 1987]:

$$MCH = \frac{Hb}{Er}; MCHC = 10 \frac{Hb}{Ht},$$

где

Hb – концентрация гемоглобина ($г л^{-1}$);

Er – число эритроцитов (клетки $мкл^{-1}$);

Ht – гематокрит (%).

5.1. Функциональная морфология эритроцитов гемолимфы *A. inaequalvis*

Зрелые эритроидные элементы гемолимфы моллюска имеют практически округлую форму (рис. 5.1). При линейных размерах $14,54 \pm 0,59$ мкм (C_1) и $12,76 \pm 0,61$ мкм (C_2) разница между этими величинами не превышала 2 мкм – $1,79 \pm 0,06$ мкм (табл. 5.1). Клетки сравнительно крупные. Среднеклеточный объем (V_c) и площадь поверхности (S_c) составляли соответственно $359,39 \pm 9,28$ $мкм^3$ и $558,69 \pm 14,04$ $мкм^2$, при сопоставимых с другими гидробионтами (морские рыбы) величинах удельной поверхности клетки (S_c/V_c) – $1,558 \pm 0,002$ $мкм^{-1}$ [Новицкая, 2012a]. Высокая удельная поверхность эритроцита анадары облегчает диффузию кислорода через оболочку клетки и ассоциацию его с гемоглобином, а также повышает ее способность к деформации в момент циркуляции.

Эритроидные элементы гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца...

Цитоплазма ацидофильная, что связано с высоким содержанием гемоглобина. Величина MCH составляла $180,64 \pm 32,51$ пг. При этом $MCHC$ соответствовала значениям известным для других водных организмов – $22,12 \pm 3,25$ % [Парфенова, Солдатов, 2011; Новицкая, 2012a].

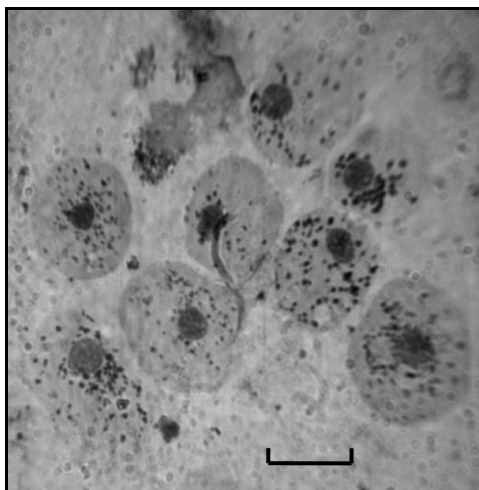


Рис. 5.1. Эритроидные элементы *Anadaraequeivalvis* (видны зернистые включения и эксцентрично расположенное ядро; масштабная линейка – 10 мкм)

Эритроциты анадары содержат ядро. Оно имеет округлую форму, располагается эксцентрично и занимает приблизительно 1/12 объема клетки. Это компактное образование ($V_n = 29,93 \pm 0,73$ мкм³) базофильной окраски с высокой долей гетерохроматина, что отражает низкую функциональную активность данной структуры (табл. 5.2). Большой и малый диаметры (N_1 , N_2) ядра составляли соответственно $4,25 \pm 0,14$ и $3,57 \pm 0,15$ мкм. Площадь поверхности (S_n) – $45,99 \pm 0,74$ мкм² при сопоставимой с клеткой величине удельной поверхности (S_n/V_n) – $1,643 \pm 0,015$ мкм⁻¹. Отличительной особенностью эритроцитов анадары являлись крайне низкие значения ядерно-плазматического отношения (V_n/V_c) – $0,083 \pm 0,001$ [Новицкая, 2012б].

Таблица 5.1

Цитометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы анадары

Показатели	n	Контролируемые значения			V, %
		$\bar{x} \pm S_x$	x_{min}	x_{max}	
C_1 , мкм	17	$14,54 \pm 0,14$	13,51	15,71	4,06
C_2 , мкм	17	$12,76 \pm 0,15$	11,84	13,73	4,76
$C_1 - C_2$, мкм	17	$1,79 \pm 0,06$	1,44	2,47	14,92
V_c , мкм ³	17	$359,39 \pm 9,28$	299,19	432,79	10,65
S_c , мкм ³	17	$558,69 \pm 14,04$	468,83	668,90	10,36
S_c/V_c , мкм ⁻¹	17	$1,558 \pm 0,002$	1,540	1,570	0,65

Примечание: n – число особей

Совокупность рассмотренной выше информации позволяет констатировать, что ядерные эритроциты анадары представляют собой узкоспециализированные клетки с подавленной функцией ядра и как следствие ограниченным сроком функционирования. При просмотре препаратов нами не были обнаружены эритроидные элементы на ранних стадиях дифференцировки, обладающие базофильной цитоплазмой, крупными ядрами с высоким уровнем эухроматина [Солдатов, 2005а]. Это отражает крайне низкую интенсивность эритропоэтических процессов и, вероятно, значительную продолжительность жизни эритроцитов у данного вида моллюска.

Таблица 5.2

Цитометрические характеристики ядер эритроидных элементов гемолимфы анадары

Показатели	<i>n</i>	Контролируемые значения			V, %
		$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	x_{min}	x_{max}	
N_1 , мкм	17	4,25±0,03	3,99	4,56	3,29
N_2 , мкм	17	3,57±0,04	3,38	3,83	4,10
N_1-N_2 , мкм	17	0,68±0,04	0,47	1,00	21,79
V_n , мкм ³	17	29,93±0,73	25,35	35,74	10,04
S_n , мкм ³	17	45,99±0,74	41,34	51,93	6,67
S_n/V_n , мкм ⁻¹	17	1,643±0,015	1,530	1,710	3,73

Примечание: *n* – число особей

Следует отметить, что в гемолимфе анадары присутствует достаточно высокий процент клеток с признаками лизиса – 13,3±2,1 %. Это косвенно свидетельствует о значительном возрасте клеточной массы [Siddalletal., 1995]. Известно, что у ряда гидробионтов кроветворная ткань на протяжении годового цикла функционирует ограниченный промежуток времени (2-3 месяца), который приурочен к постнерестовому периоду [Маслова и др., 1988; Маслова, Тавровская, 1991; Солдатов, 2005б]. В остальное время эритроцитарная масса равномерно стареет, что находит отражение в морфологических характеристиках клеток. Не исключено, что эта особенность физиологии эритропоэза характерна и для моллюсков.

Отличительной чертой эритроцитов анадары являлось наличие в цитоплазме крупных базофильных зернистых включений (рис. 5.2А). Зерна размером 0,33-0,66 мкм располагались вблизи ядра в количестве 41,95±2,75 единиц на клетку.

Природа этих включений исследуется уже на протяжении более чем 120 лет, начиная с работ [Cuénot, 1891]. Показано, что они характерны только для эритроцитов анадары, но и ряда других морских беспозвоночных [Glomski, Tamburlin, 1990; Bailly, Vinogradov, 2005]. По данным электронной микроскопии – это округлые сравнительно гомогенные образования, не имеющие какой-либо внутренней организации [Holdenetal., 1994]. Гистохимические исследования позволили выявить в них пероксидазную активность, железо, жиры, витамин С, слабую лизосомальную активность [Holdenetal., 1994]. Ряд авторов сходится во

Эритроидные элементы гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца...

мнении, что эти включения содержат уникальный гем, входящий в состав гематина, который используется как резерв железа при синтезе гемоглобина [Vismann, 1993; Holdenetal., 1994]. При этом Висман [Vismann, 1993] связывает с гематином способность моллюска нейтрализовать повышенные концентрации сульфидов, высокий уровень которых практически всегда сопровождает гипоксические и аноксические условия морской среды. В настоящей работе впервые было показано, что зернистые включения в цитоплазме эритроцитов анадары не являются постоянными образованиями. По мере снижения функциональной активности клетки: уменьшении значений ядерно-плазматических отношений (V_n/V_c), эти структуры постепенно исчезают. При V_n/V_c близких к 0,09 зерна хорошо представлены в цитоплазме клетки (рис. 5.2А), при V_n/V_c близких к 0,06 размеры зерен существенно уменьшаются (рис. 5.2Б), а при V_n/V_c близких к 0,04 они практически не встречаются (рис. 5.2В).

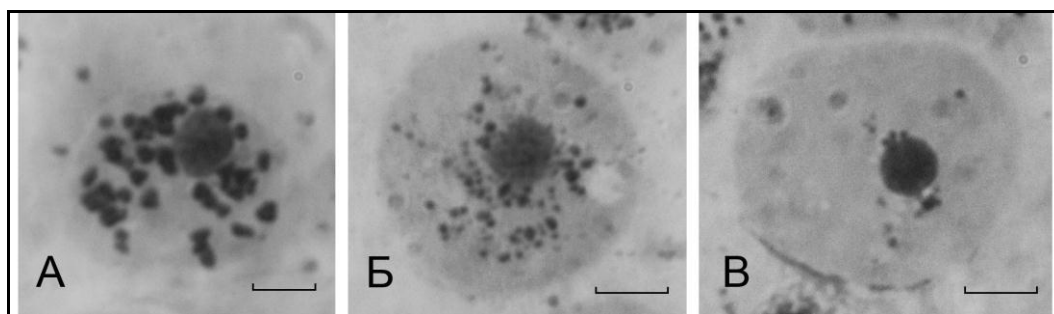


Рис. 5.2. Соотношение между размерами клетки и числом зернистых включений (А – эритроциты с V_n/V_c близким к 0,09, Б – эритроциты с V_n/V_c близким к 0,06, В – эритроциты с V_n/V_c близким к 0,04; масляная иммерсия, 1500×; масштабная линейка – 5 мкм)

Отмечено также, что данные включения располагаются в основном вблизи ядра клетки. Это хорошо заметно в случаях энуклиации, когда ядро выталкивается из клетки вместе со скоплением зерен, что позволяет предположить их связь с гранулярным ретикуломом (рис. 5.3А). Подобные события отмечали в $0,76 \pm 0,26$ % случаев.

Энуклиация может сопровождаться и образованием безъядерных клеток (рис. 5.3Б). Их наблюдали в гемолимфе моллюска в $1,8 \pm 0,2$ % случаев. К этому же могут приводить и процессы amitotic цитокинеза ($1,2 \pm 0,2$ % случаев) при сохранении ядра в одной из дочерних клеток (рис. 5.3В). Изредка наблюдали эритроциты с двумя ядрами со сравнительно высокой долей эухроматина ($1,20 \pm 0,21$ % случаев) (рис. 5.3Г). Это, по-видимому, является следствием того, что процессы кардио- и цитокинеза эритроидных элементов у анадары могут быть разнесены во времени.

Таким образом, эритроциты гемолимфы анадары – это узкоспециализированные клетки с высоким внутриклеточным содержанием гемоглобина, повышенной удельной поверхностью и функционально малоактивным ядром, о чем свидетельствует крайне низкие значения ядерно-плазматических отношений. Ядро клетки имеет незначительный объем с высокой долей гетерохроматина. Цитоплазма эритроцитов содержит гранулярные

включения. Они не являются постоянными структурами. Их присутствие связано с функциональной активностью клетки. При ядерно-плазматическом отношении близком к 0,04 включения практически не выявляются. Гемолимфа моллюска не содержит эритроидных элементов на ранних стадиях дифференцировки, что отражает нерегулярность эритропоэтических процессов в кроветворной ткани.

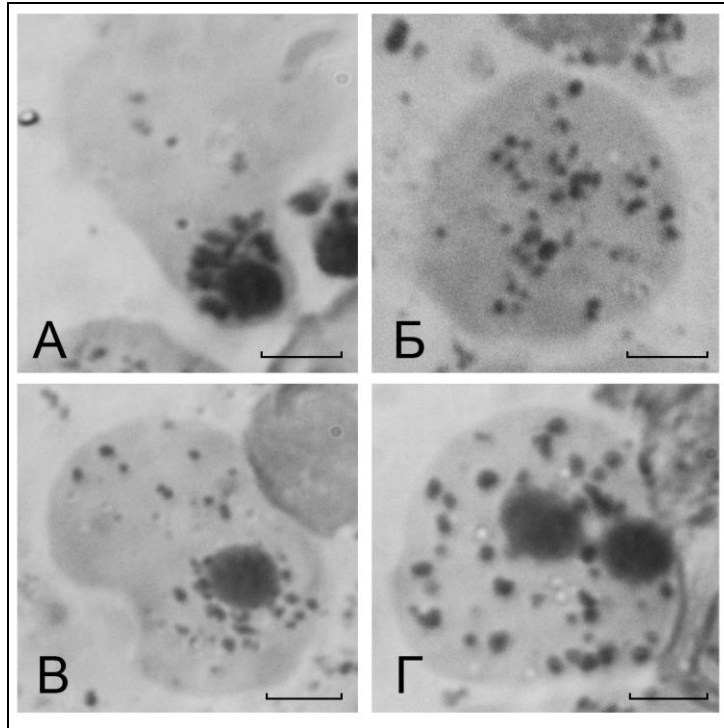


Рис. 5.3. Эритроидные элементы гемолимфы анадары (А – энуклиация, Б – безъядерная клетка, В – амитотический цитокинез, Г – двуядерная клетка; масляная иммерсия, 1500×; масштабная линейка – 5 мкм).

5.2. Эритроидные элементы гемолимфы *A. inaequalis* в условиях экспериментальной аноксии

Экспериментальная часть работы выполнена на специально разработанном стенде. Он позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объемом 13,5 л помещали 30 особей *A. inaequalis* (длина раковины 30–33 мм). Содержание кислорода в воде снижали в течение 2,5–3,0 часов с 8,5–8,7 до 0 мг л⁻¹ прокачиванием N₂. Контроль за величиной P_{O₂} осуществляли потенциометрически. В работе применяли оксиметр ELWRON 5221 (Польша). Температура воды поддерживали на уровне 20±1°C. Фотопериод – 12 часов день:12 часов ночь. Экспозиция – 3-е суток. Контрольная группа моллюсков содержалась в аналогичных условиях при концентрации кислорода в воде 8,5–8,7 мг л⁻¹ (95–97 % насыщения). Ежедневно в опыте и контроле производили полную смену воды в емкостях для удаления метаболитов.

Эритроидные элементы гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца...

5.2.1. Гематологические исследования

Концентрация гемоглобина, число эритроцитов и гематокрит у контрольной группы моллюсков составляли соответственно $21,1 \pm 3,1$ г л⁻¹, $53,5 \pm 12,8$ (10^3) клеток мкл⁻¹, $4,79 \pm 1,07$ % [Новицкая, Солдатов, 2011]. В условиях экспериментальной аноксии они не претерпевали существенных изменений. Отмечалась лишь некоторая тенденция понижения значений первых двух показателей и рост последнего (рис. 5.4). Однако различия не были статистически выражены.

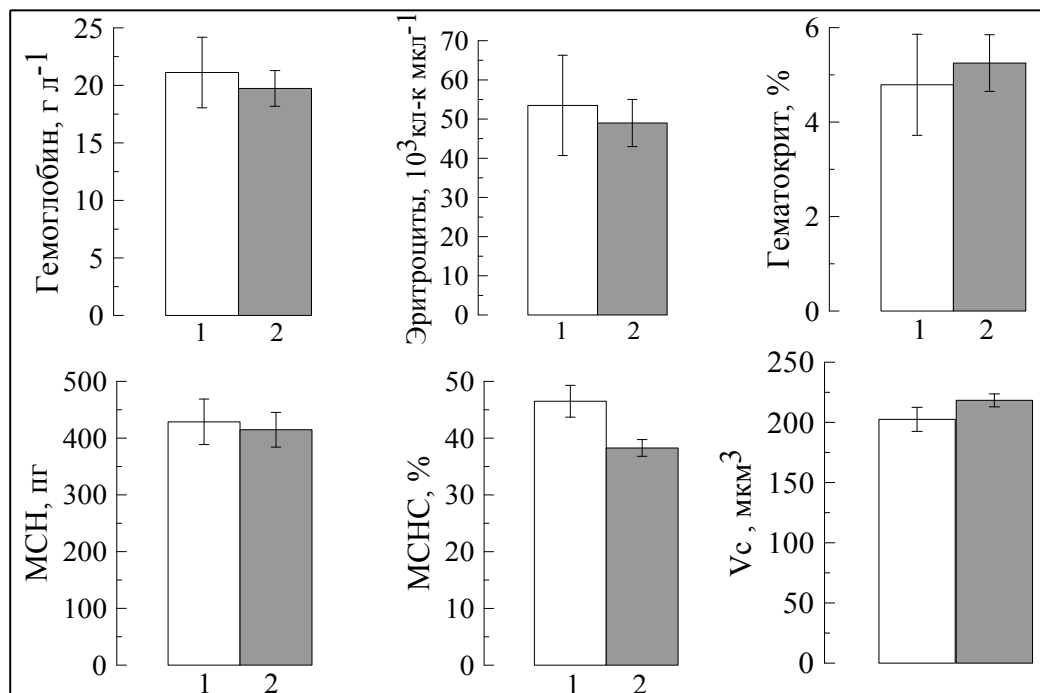


Рис. 5.4. Гематологические характеристики и эритроцитарные индексы анадары в условиях (1) нормоксии (объем выборки – 10 особей) и (2) аноксии (объем выборки – 13 особей)

Расчет же эритроцитарных индексов, проведенный на основе гематологических характеристик гемолимфы анадары, напротив, показал наличие значимых изменений (рис. 5.4). Объем клетки (V_c) имел тенденцию увеличения и составил $218,35 \pm 5,37$ мкм³. Это происходило на фоне снижения $МСНС$ при сохранении значений $МСН$. Такое соотношение показателей предполагает набухание клеток (свеллинг).

5.2.2. Осмотическая стойкость эритроцитов

Первые признаки лизиса эритроидных клеток у контрольной группы животных отмечали при $0,52 \pm 0,02$ % NaCl (минимальная резистентность). Полное разрушение наблюдали при $0,18 \pm 0,01$ % NaCl (максимальная резистентность) (рис. 5.5). Диапазон резистентности был сравнительно широк и составлял $0,34 \pm 0,01$ %

NaCl, что отражает достаточно высокую степень гетерогенности циркулирующей эритроцитарной массы в отношении данных характеристик.

В условиях аноксии наблюдался значительный рост значений минимальной резистентности клеток красной крови. Начало лизиса эритроидных элементов происходило при более низких концентрациях NaCl – $0,40 \pm 0,02$ %, что на 23,1 % ($p < 0,001$) ниже значений, отмеченных для контрольной группы моллюсков.

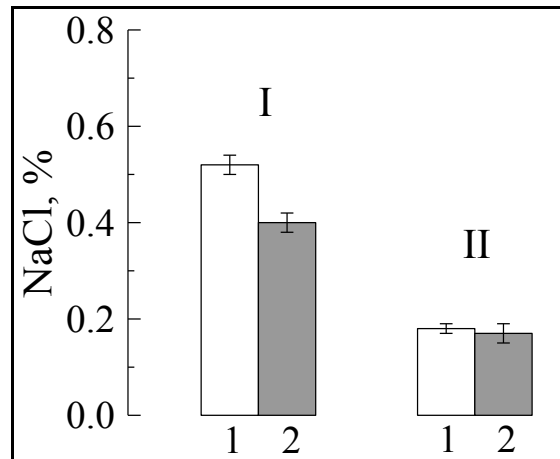


Рис. 5.5. Осмотическая резистентность эритроцитов анадары в условиях (1) нормоксии (объем выборки – 10 особей) и (2) аноксии (объем выборки – 13 особей): I – минимальная, II – максимальная

Значения же максимальной резистентности сохранялись на уровне контрольных величин. Одновременно уменьшался и диапазон резистентности на 22,4 % ($p < 0,01$), то есть эритроидная популяция клеток становилась более гомогенной.

5.2.3. Морфометрические характеристики эритроцитов

Эритроидные элементы гемолимфы контрольной группы моллюсков (нормоксия) имеют слегка эллипсоидную форму: большой (C_1) и малый (C_2) диаметры клетки составили $11,34 \pm 0,24$ и $10,20 \pm 0,26$ мкм соответственно (табл. 5.3). Зависимость между C_1 и C_2 хорошо описывается уравнением линейной регрессии (рис. 5.6) с достаточно высоким коэффициентом детерминации (R^2) – $0,68 \pm 0,06$, что свойственно клеткам, имеющим округлую форму (табл. 5.4). Цитоплазма ацидофильная, что отражает присутствие гемоглобина. Она также содержит зернистые базофильные включения в количестве $21,8 \pm 0,7$ единиц на клетку. На мазках обнаруживаются разрушенные клетки – эритроцитарные тени. Количество их не превышает 14 % от общей клеточной массы (табл. 5.3).

Клетки содержат ядро. Оно небольшое и также имеет эллипсоидную форму. Продольные (N_1) и поперечные (N_2) размеры этой структуры соответствуют $3,93 \pm 0,10$ и $3,18 \pm 0,07$ мкм (табл. 5.3). Объем ядра (V_n), рассчитанный по формуле эллипсоида вращения, составил $21,97 \pm 1,63$ мкм³.

Распределение величин V_n носило сложный характер (рис. 5.7). Ранжирование выборочной совокупности с величиной классового промежутка 20

Эритроидные элементы гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца...

мкм позволило показать, что основная масса клеток (более 40 %) имели ядра с объемом менее 20 мкм. Содержимое ядра компактное с высококонцентрированным хроматином, цвет резко базофильный, что отражает низкую функциональную активность данной структуры. Об этом же свидетельствуют пониженные значения ядерно-плазматического отношения (V_n/V_c) – $0,112 \pm 0,006$.

Таблица 5.3

Цитометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы анадары в условиях нормоксии (объем выборки – 10 особей) и аноксии (объем выборки – 13 особей)

Показатели	Контроль	Аноксия
C_1 , мкм	$11,34 \pm 0,24$	$11,56 \pm 0,13$
C_2 , мкм	$10,20 \pm 0,26$	$10,55 \pm 0,13$
N_1 , мкм	$3,93 \pm 0,10$	$4,13 \pm 0,05$
N_2 , мкм	$3,18 \pm 0,07$	$3,46 \pm 0,03$
$(C_1 - C_2)$, мкм	$1,14 \pm 0,06$	$1,01 \pm 0,03$
$(N_1 - N_2)$, мкм	$0,75 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,02$
Число зерен, шт.	$21,8 \pm 0,7$	$29,8 \pm 0,6$
Поврежденные клетки, %	$13,3 \pm 2,1$	$56,3 \pm 5,0$

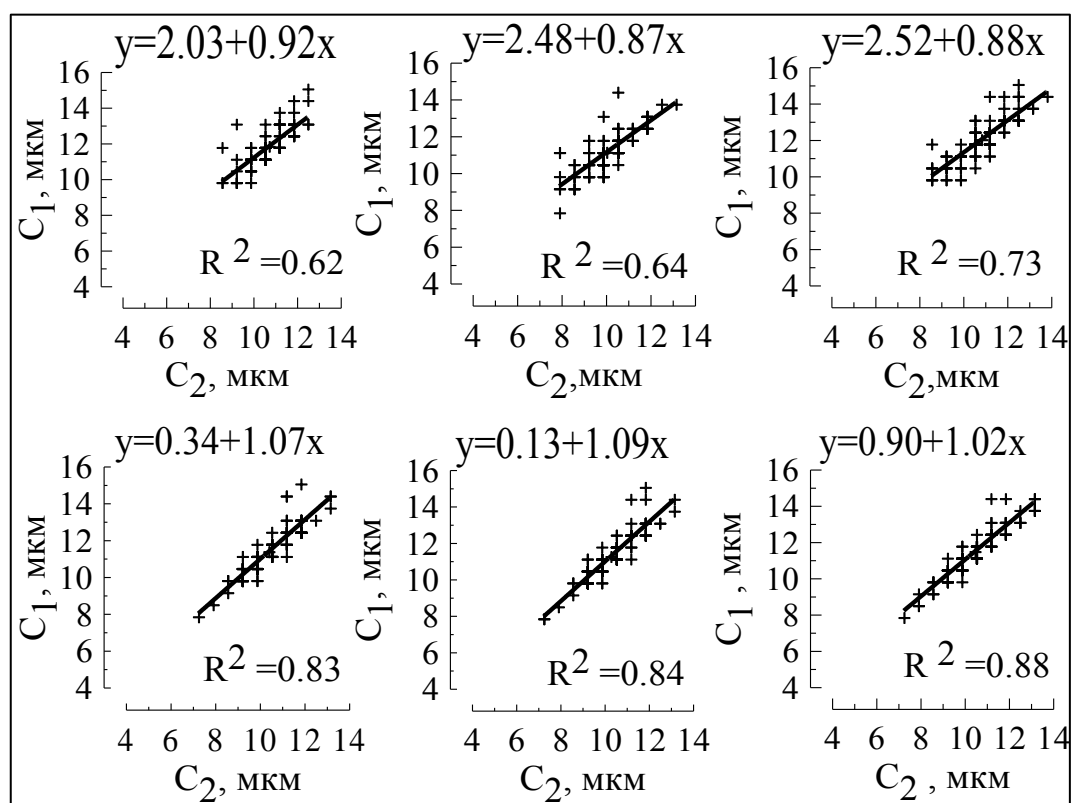


Рис. 5.6. Зависимость C_1 от C_2 у отдельных особей анадары в условиях нормоксии (верхний ряд) и аноксии (нижний ряд) (объем выборки – 100 клеток)

Аноксия сопровождалась ростом линейных размеров клеток красной крови и их ядер. Отмечалось незначительное увеличение продольного и поперечного сечения эритроцитов (C_1 , C_2) относительно контрольной группы животных (табл. 5.3). Клетки становились более округлыми. Разница C_1 - C_2 уменьшалась на 11,4 %. Зависимость между C_1 и C_2 становилась более выраженной. Об этом свидетельствовал рост значений коэффициента b в уравнении линейной регрессии на 18,6 % ($p < 0,001$) и увеличение значений R^2 на 23,5 % ($p < 0,001$) (рис. 5.6, табл. 5.4). Существенно возрастало и число зернистых включений в цитоплазме на 36,7 % ($p < 0,001$) (табл. 5.3). Количество разрушенных клеток было в 4,2 раза выше, чем в гемолимфе моллюсков контрольной группы.

Таблица 5.4
Параметры уравнения линейной регрессии отражающие зависимость C_1 от C_2

Показатели	Контроль	Аноксия
a	2,53±0,53	0,85±0,23
b	0,86±0,05	1,02±0,02
R^2	0,68±0,06	0,84±0,02

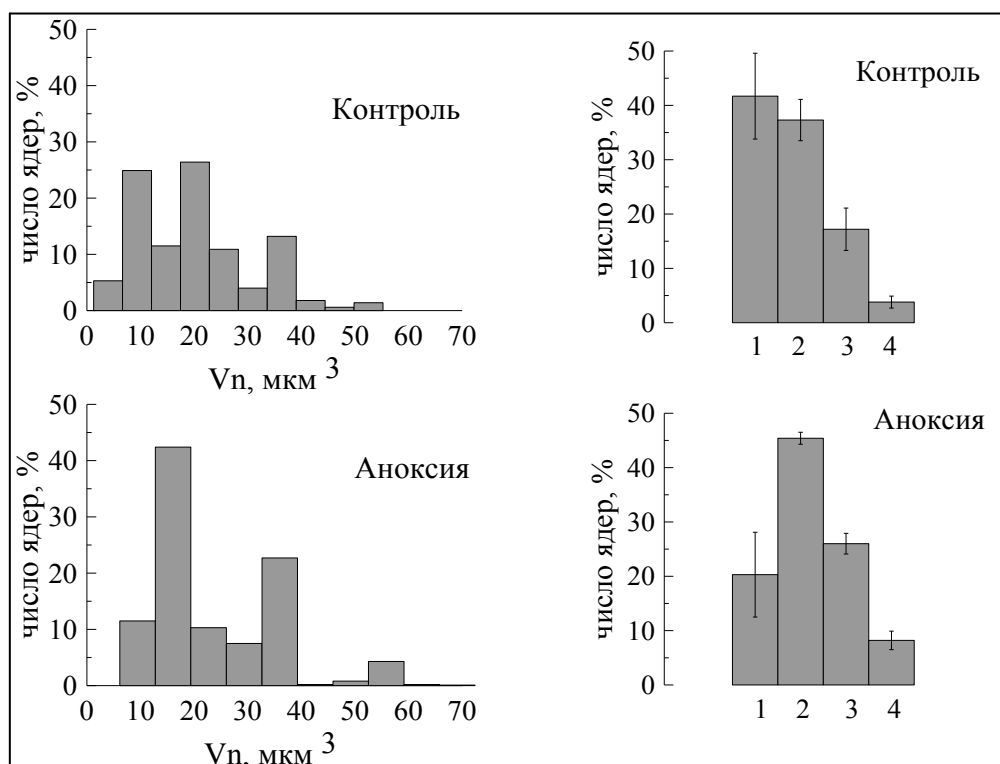


Рис. 5.7. Распределение эритроидных элементов гемолимфы анадарты в соответствии с объемом ядра в условиях нормоксии (объем выборки – 1000 клеток) и аноксии (объем выборки - 1300) (слева – фактическое распределение; справа – распределение после ранжирования; 1 – до 20 мкм³, 2 – 20-29 мкм³, 3 – 30-39 мкм³, 4 – более 40 мкм³)

Эритроидные элементы гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца...

Параллельно увеличивались и линейные размеры клеточных ядер (N_1 , N_2) на 5-8 % (табл. 5.3). Особенно был заметен рост объема ядра – 23,8 % ($p < 0,01$). В клеточной популяции возрастало число эритроидных элементов с объемом ядра 20-30 мкм (рис. 5.7). Увеличение же размеров данной структуры было пропорционально росту объема клетки (табл. 5.3). Ядерно-плазматический индекс V_n/V_c не изменялся [Солдатов и др., 2011].

Из представленных результатов следует, что аноксия вызывает ряд однозначных изменений в функциональном состоянии, морфологии и размерных характеристиках эритроидных элементов гемолимфы моллюска:

- увеличение линейных и объемных характеристик клеток и их ядер;
- лизис значительной части эритроидных элементов на фоне роста их стойкости к осмотическому шоку;
- повышение числа базофильных включений в цитоплазме.

Следует отметить, что рост объема клетки (V_c) в условиях внешней аноксии происходил на фоне снижения средноклеточной концентрации гемоглобина ($MCHC$) при сохранении абсолютного содержания данного соединения в эритроците (MCH). Такое соотношение показателей возможно только при гидратации цитоплазмы клетки, которое приводит к ее набуханию (свеллингу). Подобная направленность процессов отмечена нами ранее и для ядерных эритроцитов скорпены [Парфенова, Солдатов, 2005]. Эта закономерность отмечена в работах многих авторов [Perry, Reid, 1994; Jensen, 2004].

Известно, что гипоксия у костистых рыб сопровождается выбросом катехоламинов (адреналина, норадреналина) в циркулирующую кровь [Perry et al., 1999; Jensen, 2004]. Связываясь с β -адренорецепторами эритроцитарных мембран эти соединения индуцируют трансмембранный Na^+/H^+ обмен [Nikinmaa, 1991; Jensen, 2004]. Натрий, как осмотически активный катион повышает содержание воды в цитоплазме, что и приводит к увеличению объема клетки в целом. Можно допустить, что данный механизм в условиях аноксии реализуется и в эритроидных элементах гемолимфы анадары.

Гидратация цитоплазмы и как следствие набухание клеток должно сопровождаться их частичным лизисом, что в действительности и имело место. Число эритроцитарных телей (разрушенные клетки) на мазках гемолимфы опытной группы моллюсков повышалось более чем в 4 раза. Лизису, по всей видимости, подвергались наиболее старые клетки, для которых характерна низкая эластичность мембранных структур и как следствие пониженная устойчивость к осмотическому шоку [Lane, Tianang, 1992]. Это должно было приводить к относительному росту содержания в гемолимфе эритроидных элементов более ранних поколений. Действительно клеточная масса гемолимфы анадары в ходе эксперимента приобретала ряд морфологических и функциональных свойств, присущих молодым клеткам: повышались средноклеточный объем и линейные характеристики ядер, увеличивалось число базофильных включений в цитоплазме, росла устойчивость эритроидных элементов к осмотическому шоку.

Омоложение циркулирующей эритроцитарной массы гемолимфы моллюска может быть также связано с повышенной продукционной активностью его кроветворной ткани. Известно, что гипоксия (аноксия) индуцирует выработку эритропоэтинов в почках гидробионтов и усиливает тем самым процессы пролиферации в эритроидном ряду клеток [Wickramasinghe, 1993; Lai et al., 2006].

Глава 5

Однако в нашем случае это, по всей видимости, не происходило. Мы не отмечали появления в гемолимфе анадары в условиях аноксии мало дифференцированных эритроидных элементов, имеющих базофильную цитоплазму и крупные ядра с низкоконденсированным хроматином. Значения индекса V_n/V_c не претерпевали статистически значимых изменений. Следует также принять во внимание и продолжительность эксперимента – 3 суток. Даже при активной генерации клеток кроветворной тканью этого времени не достаточно для существенного обновления клеточной массы молодыми клетками.

Таким образом, аноксия вызывает гидратацию цитоплазмы и набухание (свеллинг) эритроидных элементов в гемолимфе анадары. Это сопровождается лизисом преимущественно старых клеточных форм, имеющих более низкую осмотическую резистентность. Разрушение старой эритроцитарной массы приводит к относительному росту содержания в гемолимфе клеток более ранних генераций. Последнее определяет увеличение средноклеточного объема ядра, содержания базофильных зернистых включений в цитоплазме и повышение устойчивости эритроидных элементов моллюска к осмотическому шоку.

Глава 6

ЦВЕТОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ РАКОВИН И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

Двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* Lam. является массовым для черноморского региона, его поселения отмечены на иловых и скальных субстратах, принципиально отличающихся по условиям абиотического окружения [Иванов и др., 1989]. Для иловых поселений характерно преобладание моллюсков со светло-коричневой окраской раковины, для скальных – с окраской черно-фиолетового цвета [Иванов и др., 1989; Казанкова, 2008].

В литературе распространено понятие «цветовая морфа», основанное на окраске створок мидии. Выделяют две морфы: черную и коричневую – реже говорят о наличии промежуточных групп. Считается, что окраска раковины является маркером комплекса генов, детерминирующих ряд физиологически значимых признаков. Так, для разноокрашенных мидий была обнаружена разница в прочности и скорости образования биссусных нитей, темпах соматического роста мягких тканей [Щербань, 2000; Щербань, Вялова, 2008], плодовитости, выживаемости [Булатов, 1984], резистентности к паразитам [Шурина, Золоторев, 1988; Мачкевский, Шадрин, 1990]. Между морфами существенно варьирует состав изоферментных спектров 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и неспецифических эстераз [Столбова, Ладыгина, 1994], разнятся активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы [Александрова и др., 2001], состав каротиноидов [Бородина, Солдатов, 2010].

Несмотря на то, что признак окраски створок широко применяется при исследовании данного моллюска, выделение цветовых морф в большинстве случаев осуществляется визуально, количество выделяемых фенотипов у разных авторов варьирует [Столбова, Пиркова, 1996; Шурина, Золоторев, 2008; Казанкова, 2010]. В этой главе представлен новый метод, позволяющий на основе количественного анализа выделять цветовые морфы мидии, с последующим определением функциональных различий между ними.

6.1. Выявление цветовых групп *M. galloprovincialis*

У мидии цвет створки формируется двумя элементами окраски: сине-фиолетовым пигментом наружного призматического слоя раковины и красно-коричневым - конхиолинового слоя [Trevelyan, 1987]. Визуально цвет створок может варьировать от светло-коричневого до черно-фиолетового [Newkirk, 1980; Иванов и др., 1989], с наличием или отсутствием радиальной исчерченности [Mitton, 1977; Столбова и др., 1996; Novac, Fusu, 2006; Шурина, Золоторев, 2008]. Химическая структура пигмента створок мидий все еще не изучена. Красно-коричневый пигмент, возможно, является меланином, склеротином или

оммохромом. Меньше можно сказать о синем пигменте призматического слоя раковин [Trevelyan, 1987].

Окраска створок мидии закладывается генетически. Об этом свидетельствует характер распределения фенотипов в популяции и результаты гибридологического анализа. Предполагается, что признак наследуется по простой однолокусной двухаллельной схеме, в которой коричневый цвет доминирует над черным, а наличие радиальной исчерченности — над ее отсутствием [Пиркова и др., 2000]. Однако в аналогичной работе на близкородственном виде *M. edulis* наблюдается отклонение от вышеуказанной схемы наследования [Newkirk, 1980]. Другая точка зрения основывается на данных об окраске кристаллического слоя раковины, который может быть чистым, с выраженными синими полосами или полностью окрашенным. В такой системе оба типа моллюсков с однотонным кристаллическим слоем считаются гомозиготами, а с полосатым — гетерозиготами с кодоминантным проявлением признака [Шурова, Золоторев, 2008].

Противоречивость данных свидетельствует о том, что в основе наследования признака окраски лежит более сложная схема. К примеру, множественный аллелизм гена окраски, при котором несколько доминантных коричневых аллелей различаются по своему фенотипическому проявлению в гетерозиготе. Цвет створок может формироваться также группой локусов (цвет, радиальная исчерченность и т.д.) [Newkirk, 1980].

Преобладание разных фенотипических групп на разных глубинах приводит к мысли о зависимости цвета створок от степени освещенности. Эта версия частично подтверждается экспериментами по выращиванию моллюсков в условиях искусственного освещения. Для *M. edulis* [Trevelyan, 1987] и для *M. galloprovincialis* [Казанкова, 2010] зафиксировано усиление интенсивности окраски раковины под воздействием освещения. Показано, что фактор света индуцирует отложение как коричневого пигмента периостракума, так и сине-фиолетового пигмента призматического слоя.

Адаптивность признака не противоречит его генетической обусловленности. Скорее всего, свет не формирует окраску, а только влияет на интенсивность экспрессии пигмента, заложенного генетически.

6.1.1. Разработка метода цветовой дифференциации моллюсков

Разделение мидий на цветовые группы, как правило, производится визуально. Количество выделяемых фенотипов варьирует. Отсутствие единого критерия, применяемого для дифференциации цветовых морф, затрудняет исследования данного вопроса.

Для описания интенсивности и характера окраски биологических объектов широкое применение получил метод цифровой обработки фотографий. Он позволяет описать цвет количественно [Козминский, Лезин, 2006]. Это побудило нас использовать данный подход для дифференциации цветовых морф моллюсков [Куликова, 2012].

В основе новой методической разработки лежит фотографирование предварительно очищенных и высушенных раковин моллюска. Объекты были сфотографированы с помощью фотоаппарата OLYMPUS CAMEDIA C-7070 WIDE ZOOM. Съемка проводилась в темной камере, специально сконструированной для

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

унификации условий фотографирования (рис. 6.1). На крыше камеры расположен тубус для фиксации объектива фотокамеры. Непосредственно под ним закреплена кольцевая люминесцентная лампа: модель BRILUM FCS 22 W (температура 4000 К, световой поток 1650 Лм, частота 6000 Гц). Такое расположение освещения препятствует попаданию прямых лучей в объектив и затенению объекта съемки. В корпусе камеры имеется закрывающаяся дверца. Ошибка, вызванная колебаниями освещения при скачках напряжения в сети, нейтрализовалась длительностью выдержки фотоаппарата (0,5 с). Степень раскрытия диафрагмы выставлялась вручную (F11). Для удаления бликов, раковина помещалась в воду.

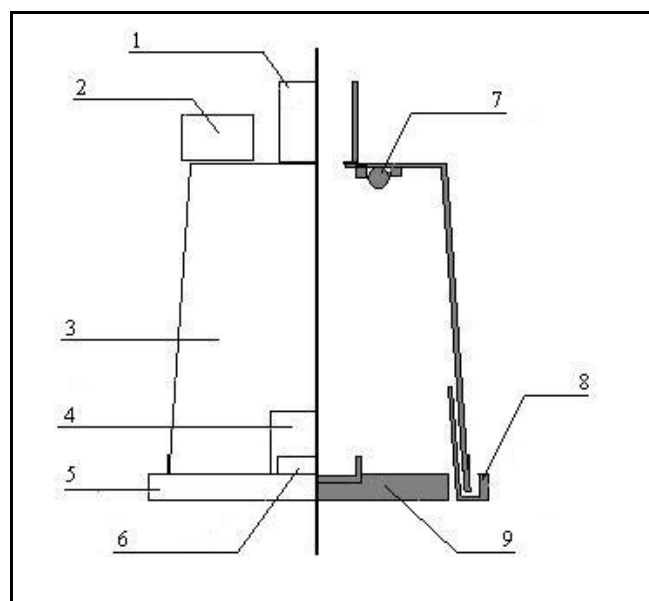


Рис. 6.1. Камера для фотографирования (сборочный чертеж) (1 – тубус для фиксации объектива, 2 – блок питания, 3 – корпус камеры, 4 – окошко, 5 – полость, 6 – чашка Петри, 7 – кольцевая лампа, 8 – подвижная дверца, 9 – дно камеры)

Полученные фотографии были обработаны в программе Adobe Photoshop CS 3. Область створки на снимках была выделена инструментом Magnetic Lasso Tool. Так как большинство мидий имеет неоднородную окраску, было произведено усреднение цвета с применением стандартного фильтра Размытие/Среднее (Blur/Average) (рис. 6.2).

При обработке данные представлены в рамках стандартных цветовых моделей RGB (Red-Green-Blue, Красный-Зеленый-Синий) и HSB (Hue-Saturation-Brightness, Тон-Насыщенность-Яркость). Красный, зеленый и синий компоненты цвета выражаются в условных единицах (у.е.) в пределах 0–255 у.е., насыщенность и яркость – 0–100 у.е., цветовой тон измеряется в градусах от 0–360°. В результате каждой створке соответствует шесть числовых значений.

С целью оценки воспроизводимости метода модельные объекты фотографировали в пяти повторностях. Повторную съемку проводили с временным интервалом в 5–20 мин.

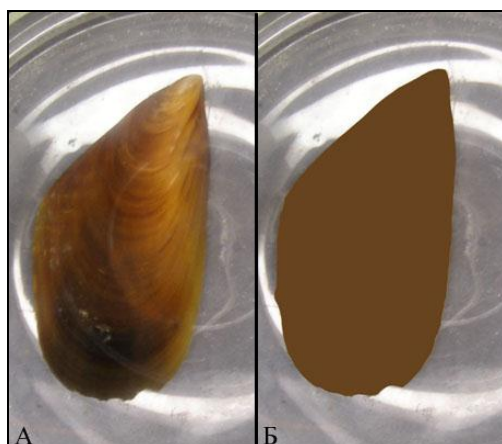


Рис. 6.2. Фотография створки *M. galloprovincialis* (А – необработанная, Б – после усреднения цвета)

Для каждой из обработанных створок рассчитывали средние значения всех цветовых параметров и ошибку. Усредненные значения ошибки по всем проанализированным створкам принимали за ошибку метода (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Цветовые характеристики после компьютерной обработки фотографий

Параметры	Диапазон вариации	Размах колебаний	$\bar{x} \pm S_x$	Коэффициент вариации, %	Ошибка метода, %
H, °	21,0-59,6	38,6	31,8±7,5	1,62	3,34
S, у.е.	5,6-59,6	54,0	38,4±21,5	3,84	9,05
Br, у.е.	14,6-53,4	38,8	29,2±11,6	2,72	3,93
R, у.е.	37,2-146	108,8	75,6±31,1	2,83	3,78
G, у.е.	34,8-99,2	64,4	56,8±16,1	1,94	3,69
Bl, у.е.	27,4-64,2	36,8	40,5±7,9	1,34	4,48

Примечание: H – цветовой тон; S – насыщенность цвета; Br – яркость; R – красный компонент; G – зеленый компонент; Bl – синий компонент цвета.

Как видно, ошибка метода при повторном фотографировании створок не превышала 5 % для большинства характеристик. Исключение составил показатель насыщенности цвета (S). Частично вариация значений цветовых характеристик вызвана системной ошибкой программы Adobe Photoshop CS 3, она составляет одну единицу для всех показателей.

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

Обнаружена тенденция к росту ошибки метода по мере увеличения интенсивности пигментации раковин. У светло-коричневых мидий она не превышала 1 % уровня, у черных приближалась к 5 %. Рост ошибки, по-видимому, объясняется пониженной чувствительностью программы к темным цветам.

Значения погрешности разработанного метода допустимы, однако, по причине колебаний числовых значений, рекомендуется проводить съемку в нескольких повторностях и использовать в дальнейших расчетах усредненные значения цвета.

Важной задачей, при разработке метода цветовой дифференциации мидий стал выбор показательной характеристики. Все шесть полученных значений обладали значительной вариабельностью (табл. 6.1). Наибольший разброс значений был отмечен для насыщенности цвета. Коэффициент вариации этой характеристики приближался к 4 %, однако ошибка при повторном фотографировании (ошибка метода) достигала 9 % уровня, что стало причиной для исключения этой характеристики из дальнейшего рассмотрения.

Среди всех показателей наибольшей вариабельностью отличались значение красного компонента (R) и яркость цвета (Bг). Об этом свидетельствуют значения коэффициентов вариации. Данные цветовые характеристики проявляют наибольшую чувствительность при распознавании окраски раковин моллюсков. Между ними обнаружена прямая линейная зависимость при $R^2=0,97$, что подтверждает информативность этих характеристик. При этом у R диапазон вариации был значительно шире, чем у Bг, что послужило основанием для выбора этой характеристики в качестве основного критерия для дифференциации цвета раковин моллюска.

6.1.2. Идентификация цветовых групп

Для проверки эффективности разработанного метода модельные объекты были разбиты на цветовые группы двумя способами: предварительно мидии были разделены визуально, позже, те же объекты дифференцировались методом цифровой обработки фотографий. Первым способом удалось выявить пять цветовых групп: светло-коричневые, темно-коричневые, с равным соотношением коричневого и черного цветов, черные с элементами коричневого и чисто черные.

Используя цифровые характеристики, полученные при обработке фотографий, было построено несколько полигонов распределений. Так как в качестве показательной характеристики было выбрано значение красного компонента (R), график, построенный в системе координат «Красный цвет – Тон», представляет наибольший интерес (рис. 6.3; 6.4).

Выделенные визуально цветовые группы не имеют изолированных цветовых значений (рис. 6.3). Значительное наложение имеется между «черными» и «черными с элементами коричневого» моллюсками. Группы «темно-коричневые» и «с равным соотношением коричневого и черного цветов» совпадают по границам распределения. Имеется взаимное перекрытие между «светло-коричневой», «темно-коричневой» группами и группой «с равным соотношением коричневого и черного цветов». Однозначно изолированы только «черная» и «светло-коричневая» группы. Переходные же варианты окраски раковины не имеют достаточной степени изоляции.

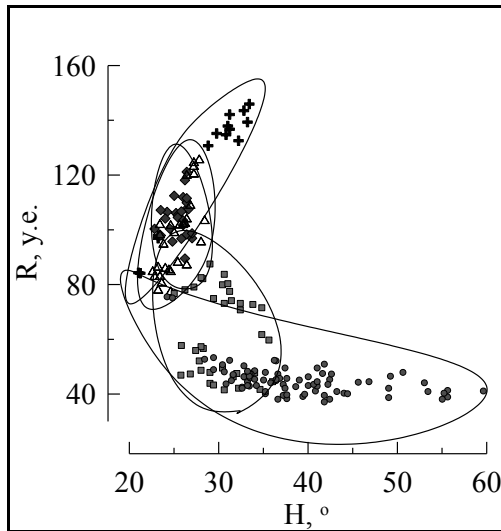


Рис. 6.3. Группы мидии, выделенные на основании визуального восприятия цвета (+ – коричневые, ♦ – темно-коричневые, Δ – с равным соотношением цветов, ■ – черные с элементами коричневого, □ – черные)

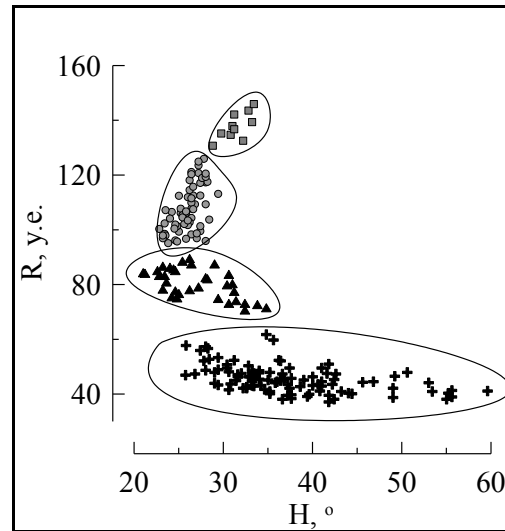


Рис. 6.4. Группы мидии, выделенные на основании цифровых характеристик цвета (■ – светло-коричневые, ● – темно-коричневые, ▲ – переходной окраски, + – черные)

Если абстрагироваться от визуальной оценки цвета раковин моллюска, то на полигоне распределения выделяются 4 изолированные группы (рис. 6.4). Они были условно обозначили как: черная (R лежит в пределах 37,2–61,8), переходная (71,6–89,6), темно-коричневая (91,2–126,0) и светло-коричневая (130,8–146,0). Статистическая обработка цифровых массивов показала, что между этими цветовыми группами по R существуют достоверные различия на уровне смежных скоплений точек при $p < 0,001$ (рис. 6.5).

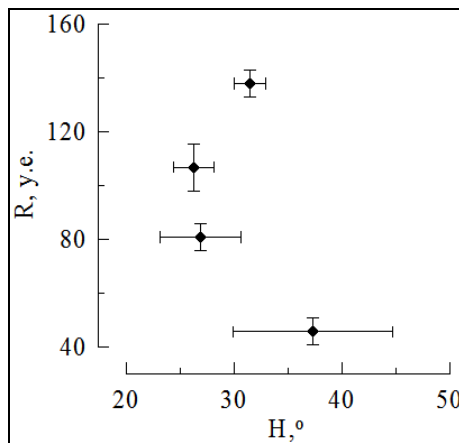


Рис. 6.5. Средние значения характеристик H и R в выделенных группах ($\bar{x} \pm S_x$)

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

Для трех из четырех выделенных групп были построены гистограммы значения R . Нормальность выборок проверялась путем сравнения экспериментальных и теоретически рассчитанных частот с использованием критерия χ^2 . При $p \leq 0,05$ достоверных различий не обнаружено. Распределение красной компоненты для черных, переходных и темно-коричневых моллюсков можно считать близким к нормальному, несмотря на то, что особи отбирались не случайным образом. Светло-коричневую группу не удалось проверить на нормальность по причине маленького объема выборки ($n=10$), однако можно предположить, что при увеличении количества исследуемых особей она будет иметь нормальный характер распределения.

Группы, выделенные методом цифровой обработки фотографий, имеют общий характер пигментации и при визуальном рассмотрении. Светло-коричневую группу составили моллюски, створки которых имеют низкое содержание коричневого пигмента. Иногда он может сохраняться в виде радиальных полос насыщенного цвета. Для мидий, отнесенных к темно-коричневой группе, в отличие от предыдущих, характерна равномерная интенсивная окраска раковины. В черную группу вошли животные, имеющие створки чисто черного цвета, иногда с малозначимыми вкраплениями коричневого. Переходная группа наиболее неоднородна по своему составу, представлена мидиями с различным соотношением черного и коричневого цветов.

Как отдельная группа рассматриваются моллюски с поврежденным конхиолиновым слоем. Створки таких мидий в результате обработки фотографий демонстрируют повышенные значения всех цветовых характеристик, что препятствует их достоверной идентификации. Отсюда следует, что для выделения цветовых групп следует использовать только цельные створки, без механических повреждений и случаев обрастания. В противном случае такие раковины нарушают границы между группами и препятствуют дифференциации моллюсков на цветовые морфы (рис. 6.6).

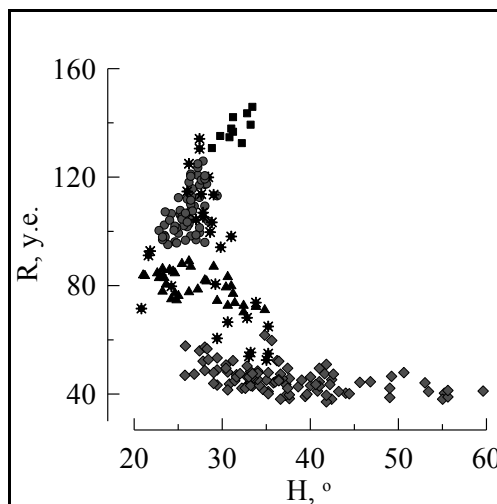


Рис. 6.6. Распределение цветовых характеристик с учетом поврежденных створок *M. galloprovincialis* (■ – светло-коричневые, ● – темно-коричневые, ▲ – переходной окраски, + – черные, Ж – с поврежденным конхиолиновым слоем)

Предложенный метод не зависит от субъективного восприятия исследователя, так как цвет створки выражается фиксированными числовыми значениями, и потому рекомендуется к использованию в биологических исследованиях. Метод обладает высокой воспроизводимостью – число выявленных групп и их цветовые характеристики сохранились в указанном диапазоне в ряде экспериментов [Куликова, 2012].

6.1.3. Асимметрия цветовых характеристик правой и левой створок раковины *M. galloprovincialis*

При изучении цветового полиморфизма раковин *M. galloprovincialis* следует изначально определиться, какая створка будет фотографироваться: правая или левая. В зооморфологии для этих целей широко применяется показатель флуктуирующей асимметрии – ненаправленного отклонения организма от билатеральной симметрии, заложенной одинаковым генотипом [Захаров и др., 2000].

Ранее уровень асимметрии рассчитывали, основываясь на размерных характеристиках правой и левой створки моллюсков [Shadrin et al., 1993; Шадрин и др., 2005]. Так как метод цифровой обработки фотографий позволяет охарактеризовать цвет в числовом эквиваленте [Куликова, 2012], и известно, что данный признак закладывается генетически [Столбова и др., 1996], становится возможным оценить уровень флуктуирующей асимметрии окраски створок.

Термин флуктуирующая асимметрия предполагает, что отклонение от билатеральной симметрии носит случайный характер. При помощи критерия знаков установлено отсутствие выраженной направленности при отклонении цветовых характеристик (уровень значимости $p \leq 0,01$).

Степень асимметрии можно рассчитать, используя следующую формулу:

$$A = \frac{\sum |X_{np_i} - X_{лев_i}|}{n},$$

где: A – показатель асимметрии;
 X_{np_i} – значение изучаемой характеристики правой створки;
 $X_{лев_i}$ – значение изучаемой характеристики левой створки;
 n – число особей.

Графический редактор Adobe Photoshop CS3 оперирует целыми числовыми значениями. Дробные числа возникают при усреднении результатов повторных снимков. Программная ошибка составляет 1 у.е. для большинства характеристик. Поэтому разница в цветовом значении между правой и левой створкой не учитывалась, если не превышала единицу. Такие створки считались «идентичными».

Доля асимметричных особей определяется из следующего уравнения:

$$\frac{n_{ao}}{n} \times 100,$$

где: n_{ao} – число асимметричных особей.

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

Асимметрия правой и левой створки для разных групп отличаются (табл. 6.2). Менее всего асимметрия выражена у черных мидий. Это характерно для всех показателей, кроме оттенка цвета (H). Низкие значения асимметрии в этой группе могут быть связаны как с более комфортными условиями развития, так и с большей устойчивостью фенотипа к внешним воздействиям.

Таблица 6.2
Значение асимметрии окраски у разных цветовых групп *M. galloprovincialis*

	H		S		Br		R		G		Bl	
	A, у.е.	п _{ао} , %	A, у.е.	п _{ао} , %	A, у.е.	п _{ао} , %	A, °	п _{ао} , %	A, у.е.	п _{ао} , %	A, у.е.	п _{ао} , %
Черные	2,5	73,5	1,8	61,2	0,6	38,8	2,0	71,4	1,7	71,4	1,7	65,3
Перех.	0,8	66,7	1,7	66,7	0,8	40,0	2,3	73,3	2,1	73,3	2,2	93,3
Темно-коричн.	0,5	34,3	1,7	65,7	1,1	57,1	3,3	91,4	2,7	82,9	2,9	82,9
Светло-коричн.	0,2	20,0	1,0	40,0	1,4	80,0	4,0	100,0	3,3	100,0	1,5	60,0

Примечание: H – цветовой тон; S – насыщенность цвета; Br – яркость; R – красный компонент; G – зеленый компонент; Bl – синий компонент цвета.

Наибольшая доля асимметричных особей и высокий уровень асимметрии по ряду характеристик (Br, R, G) наблюдается у светло-коричневых мидий, однако это может быть вызвано маленьким объемом выборки. Далее по убывающей идет темно-коричневая и переходная группы, в которых значения асимметрии по данным характеристикам были умеренными.

Асимметрия синего компонента цвета более выражена у переходной и темно-коричневой группы. Так как радиальные полосы активно участвуют в формировании этих фенотипов, по-видимому, именно этот признак обеспечивает значительную часть отклонений.

6.2. Активность аминотрансфераз и альдолазы в тканях мидий с различной окраской створок раковины

Внутри черноморской популяции *M. galloprovincialis* Lam. выделяют две экологические формы: скальную мидию, формирующую свои поселения на твердом прибрежном субстрате, и иловую, заселяющую большие глубины [Иванов и др., 1989]. Моллюски, имеющие светлую окраску створок, количественно преобладают в иловых поселениях, в скальных более многочисленны темноокрашенные особи [Иванов и др., 1989; Казанкова, 2008].

Сравнительная оценка абиотических условий этих двух биотопов позволяет предположить, что основным фактором, определяющим направление действия естественного отбора, является содержание кислорода в морской среде. Отсюда следует, что поиск различий на популяционном уровне должен быть сосредоточен на молекулярных системах, ответственных за толерантность моллюска к условиям гипоксии и аноксии.

6.2.1. Активность аспаратаминотрансферазы в тканях мидии

Аспаратаминотрансфераза (АСТ, КФ 2.6.1.1) – эндогенный фермент из класса трансфераз, катализирующий при участии кофермента пиридоксаль-5'-фосфата обратимый перенос аминокетильной группы от L-аспартата на 2-оксоглутарат с образованием оксалоацетата и L-глутамата [Кучеренко, 1979]. АСТ участвует в синтезе мочевины, мембранном транспорте, передаче нервного импульса в синапсах [Garcia-Segura et. al., 1976], внутриклеточной осморегуляции [Hammen, 1968; Zurburg, De Zwaan, 1980].

АСТ также определяет устойчивость моллюсков к экстремальным формам гипоксии и аноксии, так как сопрягает процессы белкового и углеводного обменов (аспаратат-сукцинатное направление метаболизма) [Ночахча, 1973]. У моллюсков, толерантных к анаэробно-анаэробному, отмечаются значительные ресурсы D-аспартата в раковине [Mistri et. Al., 1988].

АСТ представлена цитоплазматической (ц-АСТ) и митохондриальной (м-АСТ) фракциями [Paynter et. al., 1985]. Известно, что м-АСТ и ц-АСТ отличаются одна от другой по кинетическим свойствам [Paynter et. al., 1984a]. У *M. galloprovincialis* АСТ наследуется по шестиаллельной схеме, которая допускает существование 21 возможного генотипа. Тринадцать из них были обнаружены экспериментально [Johnson, Utter, 1973]. Отсюда следует, что система АСТ может являться удобной моделью для изучения популяционной структуры *M. galloprovincialis*.

Все исследованные мидии предварительно были разбиты на цветовые группы и охарактеризованы методом цифровой обработки фотографий. Активность фермента определялась в жабрах, ноге и гепатопанкреасе моллюсков. Ткани препарировались при температуре 0–4°C. Полученные образцы хранили при -27–28°C. Гомогенаты готовили непосредственно в день эксперимента. В качестве трансформирующей среды использовали 1,15% раствор КС1. Для получения супернатанта гомогенаты подвергали центрифугированию при 6000 об мин⁻¹ в течение 15 минут. В работе использовали рефрижераторную центрифугу К-23D (Германия). Все операции с материалом осуществляли на холоде при 0–4°C. Полученные гомогенаты использовались для определения активностей всех трех ферментов (аспаратат-, аланинаминотрансферазы и альдолазы).

Определение активности АСТ проводили унифицированным динитрофенилгидразиновым методом Райтмана-Френкеля [Камышников, 2004]. В работе использовали стандартный набор реактивов: «Simco, Ltd» (Украина). Содержание белка в пробах контролировали по методу Лоури [Lowry et. al., 1951]. Все измерения выполняли на однолучевом спектрофотометре СФ-26.

Активность АСТ варьировала от 0,02 до 0,234 мкмоль пирувата мин⁻¹ мг⁻¹ белка. Наблюдалась ее выраженная зависимость от цвета раковины моллюска (рис. 6.7). Для ноги эту связь можно описать уравнением линейной регрессии при высоких значениях R^2 (0,967). Максимальные величины были отмечены у особей со светло-коричневой окраской раковины (0,094±0,021 мкмоль пирувата мин⁻¹ мг⁻¹ белка), а минимальные – с раковиной черной окраски. Различия составили 2,8 раза ($p < 0,001$).

Близкие результаты были получены и в отношении жабр (рис. 6.8). У моллюсков со светло-коричневой окраской раковины активность АСТ составила

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

$0,065 \pm 0,012$ мкмоль пирувата мин⁻¹ мг⁻¹ белка. Это почти на 50 % выше, чем у особей с черной окраской створок ($p < 0,05$) и более чем в 3 раза выше, чем у особей с переходной и темно-коричневой окраской раковин ($p < 0,001$). При этом зависимость лучше описывалась уравнением параболической функции ($R^2 = 0,95$).

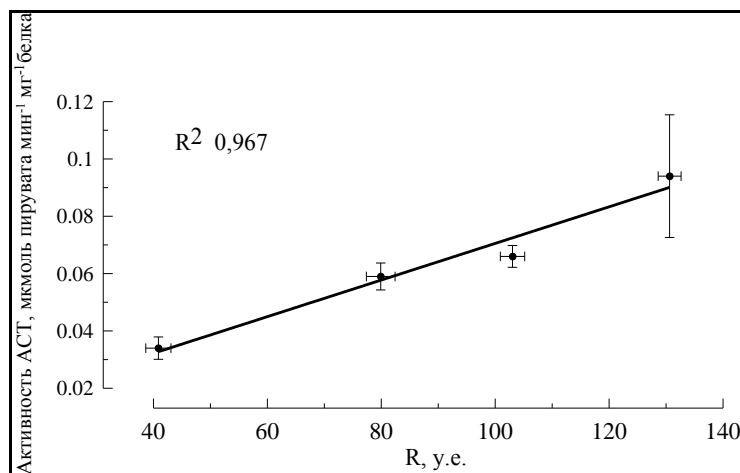


Рис. 6.7. Зависимость активности АСТ в ноге *M. galloprovincialis* от цветовой характеристики ее раковины ($\bar{x} \pm S_x$)

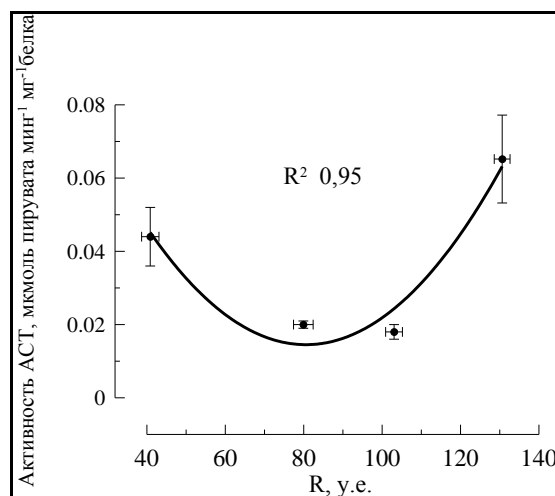


Рис. 6.8. Зависимость активности АСТ в жабрах *M. galloprovincialis* от цветовой характеристики ее раковины ($\bar{x} \pm S_x$)

Активность АСТ гепатопанкреаса не менялась в зависимости от цветовой группы моллюска (рис. 6.9). Распределение носило случайный характер.

Как уже отмечалось, АСТ сопрягает процессы белкового и углеводного обмена (аспартат-сукцинатное направление метаболизма), определяя устойчивость гидробионтов (прежде всего моллюсков) к экстремальным формам гипоксии и аноксии [Ночачка et. al, 1973]. Высокая активность АСТ у особей со светло-

коричневой окраской раковины, отмеченная в настоящей работе, вероятно, связана с особенностями условий обитания данной цветовой группы *M. galloprovincialis*. Эти моллюски чаще встречаются в донных сообществах, где отсутствует активная циркуляция в водной толще и наблюдается внешний дефицит кислорода. Моллюски с черной окраской раковины, напротив, преобладают в скальных биотопах, часто приуроченных к прибойной зоне, где возникновение гипоксии невозможно. В этом, по-видимому, лежит основная причина обнаруженных различий в активностях АСТ

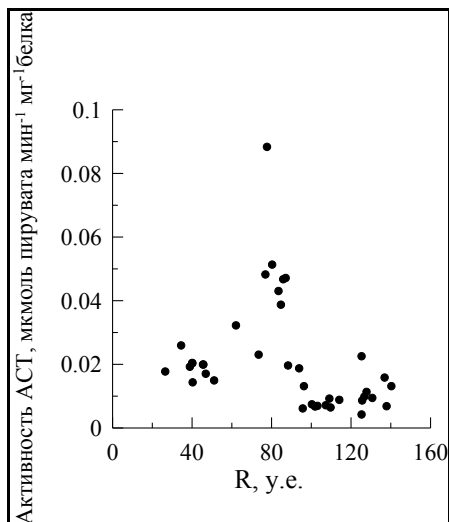


Рис. 6.9. Зависимость активности АСТ в гепатопанкреасе *M. galloprovincialis* от цветовых характеристик ее раковины

Следует отметить, что материал для проведения настоящей работы был получен с одних и тех же коллекторных установок мидийной фермы. Это означает, что условия среды были сходными для всех исследуемых моллюсков. Вместе с тем, различия в активностях АСТ между цветовыми группами *M. galloprovincialis* были значительными, что позволяет говорить об их генетической природе. Принимая во внимание шестиаллельную схему наследования АСТ, которая допускает существование 21 варианта генотипа [Johnson, Utter, 1973], можно предположить, что распределение частот аллелей между цветовыми группами, особенно черной и светло-коричневой, может иметь ряд принципиальных различий.

6.2.2. Активность аланинаминотрансферазы в тканях мидии

Аланинаминотрансфераза (АЛТ, К.Ф.2.6.1.2) – эндогенный фермент из класса трансфераз, катализирующий обратимый перенос аминогруппы от аланина к α -кетоглутарату с образованием глутамата и пировиноградной кислоты [Кучеренко, 1979].

Известно, что в условиях дефицита кислорода у гидробионтов активируется сукцинаттиокиназная реакция [Mommsen et. al., 1980], направленная на

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

образование в процессе гликолиза менее токсичных метаболитов [Kluymans, Zandee, 1983]. Этот процесс протекает под контролем АЛТ.

АЛТ в тканях *M. galloprovincialis*, также как и АСТ, представлен двумя фракциями: митохондриальной и цитоплазматической [Paynter et. al., 1985] – часто имеющими различные кинетические свойства [Paynter et. al., 1985; Hayashi, 1993]. Существуют данные, что у некоторых видов двустворок большая часть ферментативной активности приходится на м-АЛТ [Paynter et. al., 1985; Paynter et. al., 1984b].

Активность АЛТ определяли при помощи динитрофенилгидрозинового метода Райтмана-Френкеля [Камышников, 2004] с использованием стандартного набора реактивов: «Simco, Ltd» (Украина).

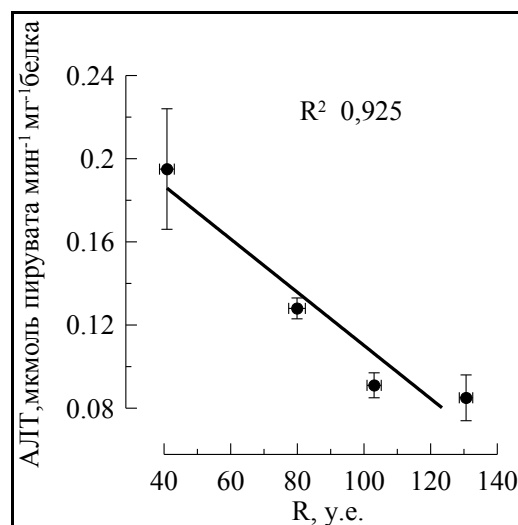


Рис. 6.10. Зависимость активности АЛТ в ноге *M. galloprovincialis* от цветовой характеристики ее раковины ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Значение активности аланинаминотрансферазы в ноге варьировала от 0,038 до 0,42 мкмоль пирувата мин⁻¹ мг⁻¹ белка (рис. 6.10), уменьшаясь по направлению от черных моллюсков к светло-окрашенным. Зависимость активности от пигментации раковины можно описать уравнением линейной регрессии ($R^2=0,925$).

Практически между всеми цветовыми группами наблюдались достоверные различия ($p<0,01$). Активность АЛТ в черной группе в 2,3 раза превышала отмеченную для коричневых групп. Исключение составили темно- и светло-коричневая группы. Различие в активности АЛТ между ними не было статистически выражено.

В тканях жабр и гепатопанкреаса характер распределения активностей среди цветовых групп напоминал рассмотренную ранее для АСТ и описывался параболической функцией ($R^2=0,891$ и $R^2=0,926$ соответственно) (рис. 6.11; 6.12). В этих тканях обе крайние группы имели достоверно более высокое значение активности, чем моллюски промежуточной окраски.

Самая высокая активность АЛТ для жаберной ткани зафиксирована у светло-коричневых особей, она превышала показатели черной группы в 2,1 раза ($p<0,005$), темно-коричневой и переходной – в 3,5–4,0 раза ($p<0,001$). Меньшая

активность наблюдается у *M. galloprovincialis* с черной окраской створок, она превышала промежуточные группы приблизительно в два раза ($p < 0,05$).

Различия между активностью АЛТ гепатопанкреаса темно- и светло-коричневых мидий фиксируются на пределе уровня значимости, что, по-видимому, связано с большой ошибкой среднего у светлоокрашенных *M. galloprovincialis*. Значение активности АЛТ для черной группы составило $0,06 \pm 0,006$ мкмоль пирувата мин⁻¹ мг⁻¹ белка, что в четыре раза превышало отмеченную у моллюсков переходной ($p < 0,001$) и в 1,76 – темно-коричневой окраски ($p < 0,005$). Активность АЛТ гепатопанкреаса для черной и светло-коричневой групп находилась на одном уровне.

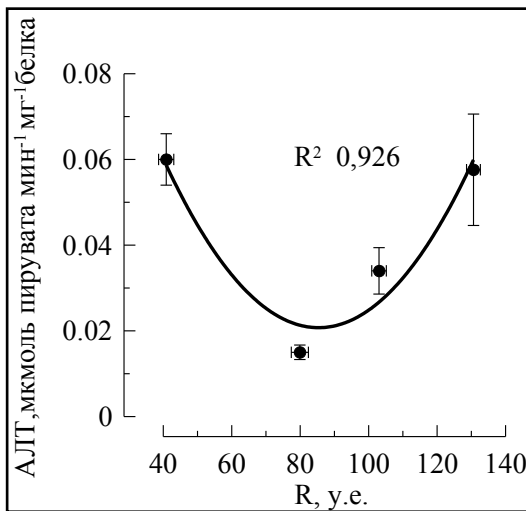


Рис. 6.11. Зависимость активности АЛТ в жабрах *M. galloprovincialis* от цветовых характеристик ее раковины ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

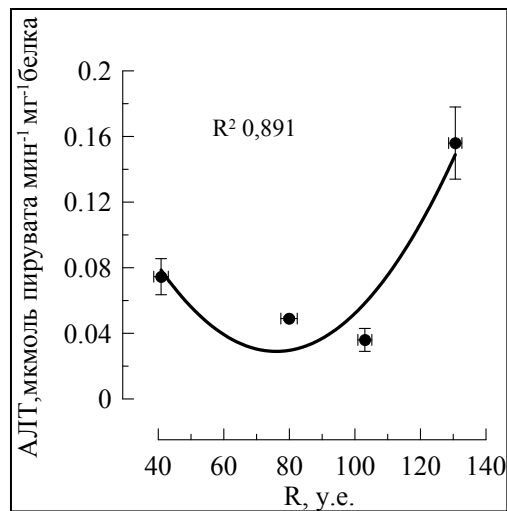


Рис. 6.12. Зависимость активности АЛТ в гепатопанкреасе *M. galloprovincialis* от цветовых характеристик ее раковины ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Изначально предполагалось, что более приспособленная к аноксии коричневая морфа должна иметь высокую активность АЛТ и в условиях отсутствия дефицита кислорода. Однако в ноге наблюдается прямо противоположная закономерность – наибольшая активность фермента характерна для черных моллюсков (рис. 6.10).

Нога мидии выполняет функцию передвижения только на личиночной стадии *M. galloprovincialis*. У взрослых моллюсков в ее основании располагается железа, секретирующая бисусс – образование, позволяющее мидии прикрепляться к субстрату. Бисуссные нити могут обрываться и перемещаться, меняя положение моллюска в пространстве [Beaumont et.al., 2007]. Структурно бисуссная нить сформирована коллагеновым стержнем и периферическим адгезивным белком [Inoue and Othe, 1994; Coyne, 2000; Lucas, 2002].

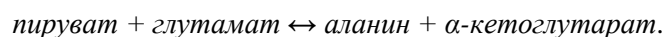
Известно, что для черной морфы *M. galloprovincialis* характерна большая интенсивность синтеза бисуссной нити [Булатов, 1984]. По-видимому, это связано

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

со спецификой местообитания – темно-окрашенные моллюски образуют поселения на скалистом субстрате [Иванов и др., 1989]. Будучи в значительной степени подверженными волновой активности, они нуждаются в прочном прикреплении к поверхности и постоянном продуцировании новых нитей взамен поврежденных.

Адгезивный белок биссуса видоспецифичен, его аминокислотная последовательность варьирует в пределах рода *Mytilus* [Inoue and Othe, 1994; Inoue et. al., 1995]. У *M. galloprovincialis* он состоит из одного неповторяющегося и группы повторяющихся декапептидных фрагментов [Inoue and Othe, 1994]. Белок биссуса считается полифенольным: для него характерно высокое содержание фенолсодержащих аминокислот (~19 % тирозина и дигидроксифенилаланина) [Waite and Tanzer, 1981; Inoue and Othe, 1994]. Кроме того, 6,8 % составляет аланин, и 19 % – пролин. Высокое содержание аланина и модифицированного пролина характерно и для коллагена [Szpak, 2011]. Обе эти аминокислоты – заменимые.

Наиболее распространенный способ биосинтеза аланина – переаминирование пирувата. Реакция катализируется АЛТ, она легко обратима, запас пирувата постоянно пополняется:



Пролин синтезируется из глутамата в ходе нескольких последовательных реакций [Lehninger et. al., 1993]. Глутамат отсутствует в первичной последовательности адгезивного белка, однако он необходим как источник для восстановления запаса свободного пролина. Существует до пяти известных путей синтеза глутаминовой кислоты, по меньшей мере два из них используют α -кетоглутарат. На стадии α -кетоглутаровой кислоты в цикле трикарбоновых кислот, она может выводиться из круга с превращением ее в L-глутаминовую кислоту несколькими путями.

Первый способ синтеза глутамата, реакция обратимого переаминирования, представлен выше. Коэффициент АЛТ близок к единице, поэтому реакция легко может протекать в обоих направлениях. Однако такой способ пополнения пула глутамата кажется мало реальным – в этом случае происходит накопление пирувата и не синтезируется аланин.

Второй путь синтеза глутамата из α -кетоглутарата контролируется ферментом глутаматдегидрогеназой:



Активное переаминирование пирувата увеличивает в ткани запас аланина и α -кетоглутарата, который в ходе ряда последовательных ферментативных реакций становится источником биосинтеза пролина.

Вероятно, специфика метаболизма в ноге мидий в первую очередь направлена на осуществление функции закрепления на субстрате, в частности на продукцию биссусной нити. В таком случае высокая активность АЛТ у черной морфы связана не с нейтрализацией метаболитов гликолиза, а с пополнением пула свободных аминокислот (пролина и аланина).

Узкая специализация ткани ноги моллюска подтверждается и другими особенностями ее метаболизма. Так, для нее показана высокая активность

супероксиддисмутазы (СОД), что, по-видимому, связано с повышенной продукцией супероксидного анион-радикала (СОАР) [Солдатов и др., 2008]. СОАР активно используется мышечными клетками для деполимеризации коллагеновых структур [Дубинина, Шугалей, 1993], являющихся одним из основных компонентов биссуса [Inoue and Othe, 1994; Coyne, 2000; Lucas, 2002]. Под воздействием волновой активности биссусные нити регулярно повреждаются. Их остатки нуждаются в утилизации, поэтому процесс деполимеризации коллагена протекает непрерывно, о чем и свидетельствует высокая активность СОД, необходимая для образования СОАР в ткани данного органа [Солдатов и др., 2008].

Распределение активности АЛТ в тканях у большинства групп носило сходный характер (рис. 6.13) Самые высокие значение были обнаружены именно в ноге. Наибольшая активность АЛТ в этом органе была показана и для других двустворчатых моллюсков [Purpo, Blasco, 1995; Солдатов и др, 2009]. Значения активностей других тканей были меньшими и имели тенденцию к убыванию в ряду: жабры, гепатопанкреас.

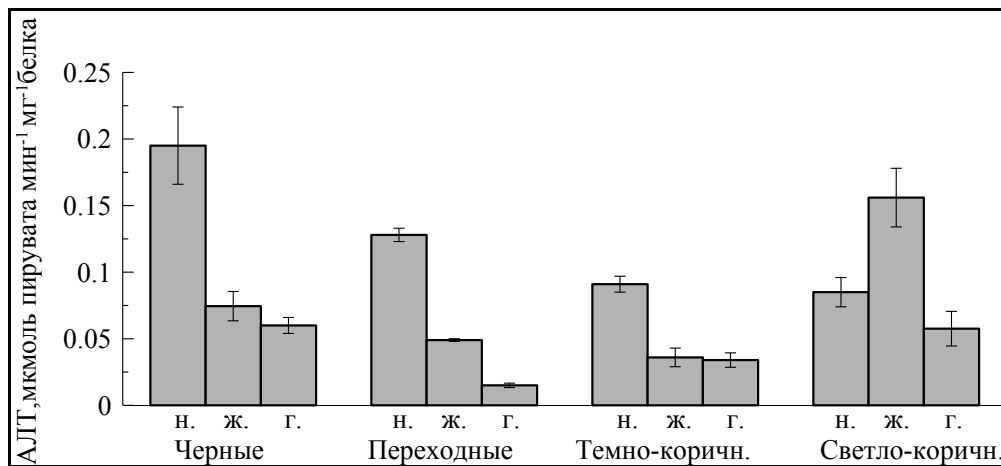


Рис. 6.13. Активностей АЛТ по тканям (н – нога; ж – жабры; г – гепатопанкреас) у четырех цветовых групп *M. galloprovincialis* ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Альтернативное распределение наблюдается в тканях *M. galloprovincialis* светло-коричневой окраски. Здесь самая высокая активность АЛТ зафиксирована в жаберной ткани. Нога и гепатопанкреас демонстрируют достоверно меньшие значения ($p < 0,005$). Это, по-видимому, отражает низкую степень участия ноги в продукции биссусных волокон у особей данной цветовой морфы, обитающих преимущественно в придонных слоях воды, где волновые явления практически не выражены.

Изоферментный состав АЛТ *M. galloprovincialis* не изучен, однако известно что существует как минимум две ее формы (цитоплазматическая и митохондриальная), обладающие различными кинетическими свойствами [Paynter et. al., 1985; Hayashi, 1993;]. Тканеспецифичность активности АЛТ черноморских мидий может объясняться присутствием в этих органах различных фракций фермента или, возможно, нескольких его аллозимов. Такое неравномерное

Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

распределение АЛТ ранее было показано для других морских двустворок [Paynter et. al., 1984; Hayashi, 1993; Puppo, Blasco, 1995].

6.2.3. Активность альдолазы в тканях мидии

Альдолаза или фруктозо-1,6-дифосфатаальдолаза (ФДФ-А, КФ 4.1.2.13) – фермент класса лиаз, участвующий в процессе гликолитического расщепления глюкозы. Альдолаза катализирует обратимую реакцию преобразования фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ) в 3-фосфоглицериновый альдегид и дигидроксиацетон-3-фосфат [Кучеренко, 1979]. В гликолизе принимает участие цитоплазматическая альдолаза.

У *M. edulis* альдолаза однородна, по-видимому, кодируется мономорфным локусом [Ahmad et.al., 1977]. Если предполагать, что цветовые морфы обладают неодинаковой приспособленностью к условиям гипоксии, то различия между ними могут проявляться и в активности альдолазы, как одного из ключевых ферментов гликолиза.

Определение активности альдолазы в тканях моллюсков осуществляли методом Товарницкого-Валуйской. Метод основан на том, что продукты расщепления фруктозо-1,6-фосфата при реакции с 2,4-динитрофенилгидразином образуют гидразоны, окрашенные в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента [Камышников, 2004]. В работе использовали специализированный набор реактивов («Химреактивкомплект», Москва).

Значение активности фермента у моллюсков варьировало как между, так и внутри цветовых групп (табл. 6.3).

Таблица 6.3

Среднее значение активности альдолазы в разных цветовых группах *M. galloprovincialis* (мкмоль ФДФ мин⁻¹ мг⁻¹ белка) ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Ткани	Черная группа	Переходная группа	Темно-кор. группа	Светло-кор. группа
Нога	0,1255±0,0359	0,0661±0,0231	0,1242±0,0470	0,1109±0,0197
Жабры	0,0922±0,0097	0,0558±0,0078	0,0748±0,0148	0,1150±0,0217
Гепат.	0,0254±0,0037	0,0182±0,0017	0,0252±0,0043	0,0207±0,0029

Как в ноге, так и в гепатопанкреасе активность альдолазы не зависела от окраски створок мидии (рис. 6.14; 6.15). Внутри всех групп наблюдался большой разброс значений. Несмотря на то, что достоверных различий выявлено не было, у *M. galloprovincialis* переходной окраски зафиксирована тенденция к уменьшению активности альдолазы по сравнению с крайними группами.

В то же время, для жабр зависимость активности фермента от цвета створок моллюска хорошо описывалась уравнением параболической функции ($R^2=0,987$) (рис. 6.16). Значения активности альдолазы для переходной группы было достоверно ниже, чем для черной (в 1,65 раз при $p<0,005$) и светло-коричневой (в 2 раза при $p<0,005$). Так как альдолаза у представителей рода *Mytilus* (например, *M. edulis*) кодируется мономорфным локусом [Ahmad et.al., 1977], то различия в ее

активности могут определяться как уровнем его экспрессии, так и процессами посттрансляционной модификации.

Следует обратить внимание на то, что моллюски, имеющие раковину с промежуточным типом окраски (переходная и темно-коричневая группы), в большинстве случаев имеют низкую активность АСТ, АЛТ и альдолазы по отношению к краевым морфам (черная, светло-коричневая группы) (рис. 6.8; 6.11; 6.12; 6.16).

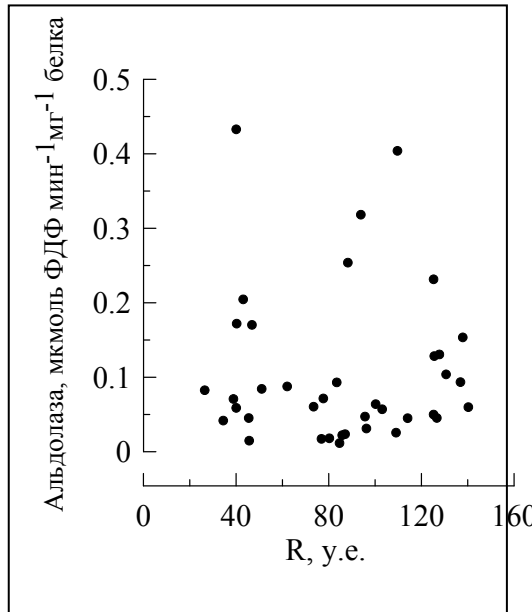


Рис. 6.14. Зависимость активности альдолазы в ноге *M. galloprovincialis* от цветовых характеристик ее раковины

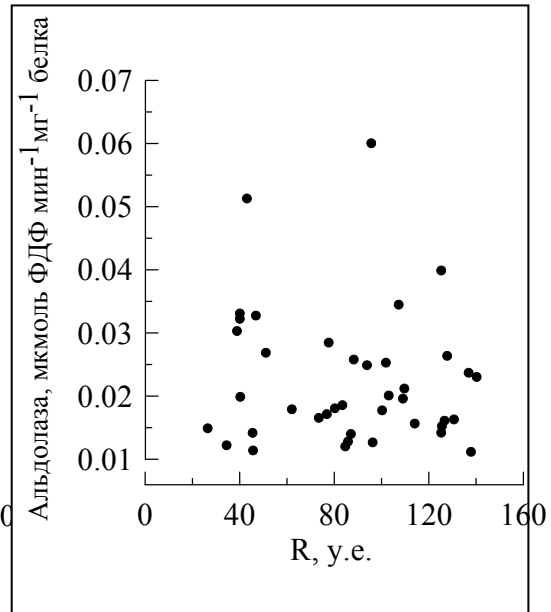
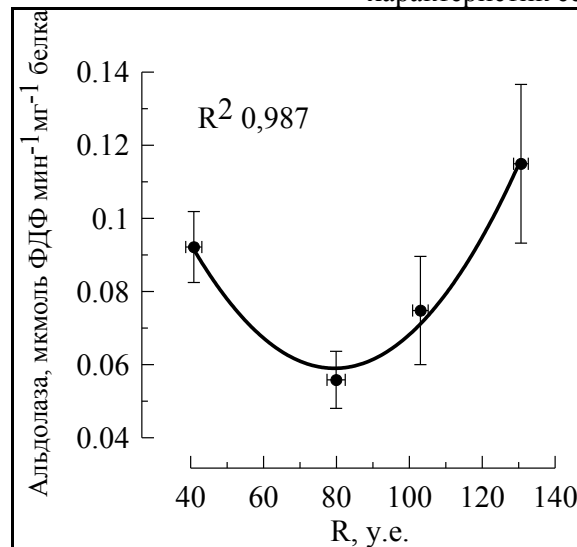


Рис. 6.15. Зависимость активности альдолазы в гепатопанкреасе *M. galloprovincialis* от цветовых характеристик ее раковины



Цветовой полиморфизм раковин и активность некоторых ферментов...

Рис. 6.16. Зависимость активности альдолазы в жабрах *M. galloprovincialis* от цветových характеристик ее раковины ($\bar{x} \pm s_x$)

Можно допустить, что они появляются как результат гибридизации последних. В этом случае повышается доля гетерозиготных локусов. Аллели, определяющие синтез ферментов анаэробного метаболизма, могут быть заблокированы, так как моллюски с промежуточным типом окраски створок раковин тяготеют в основном к скальным субстратам (аэробные условия) [Иванов и др., 1989; Казанкова, 2008].

Известно, что переориентация метаболизма с аэробного пути на анаэробный находится под контролем HIF-1 (hypoxia inducible factor), который экспрессируется в условиях гипоксии [Rees et al., 2001; Vleugel et al., 2004; Ju et al., 2007]. Водные организмы также содержат данный фактор [Rees et al., 2001; Soitamo et al., 2001; Ju et al., 2007]. Показано, что HIF-1 способен индуцировать гены, ответственные за гликолитические и эритропоэтические процессы в организме гидробионтов [Soitamo et al., 2001]. В условиях нормоксии продукция HIF-1 подавляется [Vleugel et al., 2004]. Это, как следствие, должно привести к снижению активности контролируемых нами ферментов, так как одна из аллелей (предположительно полученные от особей светло-коричневой группы) в условиях аэробной среды не будет экспрессирована.

Таким образом, применение метода фотографирования и цифровой обработки снимков раковин позволило однозначно идентифицировать 4 цветových группы *M. galloprovincialis*: черные, переходные, темно-коричневые, светло-коричневые. Между ними для ряда тканей отмечены существенные отличия в активности ферментов, задействованных в процессах анаэробного метаболизма.

- Наибольшие расхождения выявлены между крайними группами: с черной и светло-коричневой окраской раковины. Допускается, что они могут быть генетически детерминированы и связаны с толерантностью цветových морф к условиям внешней гипоксии.
- Моллюски с промежуточными типами окраски раковины: переходная и темно-коричневая группы, в большинстве случаев имели пониженную активность АСТ, АЛТ и альдолазы относительно крайних морф. Это, по-видимому, является следствием гибридизации последних и блокированием части аллелей в условиях аэробной среды.

Глава 7

ПРОЦЕССЫ РОСТА И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ У МАССОВЫХ ВИДОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ЧЕРНОГО МОРЯ

При изучении роста животных применяются различные морфометрические, физиологические и биохимические методы исследования. К последним можно отнести такие показатели, как содержание суммарных фракций РНК, ДНК и уровень белка в тканях, а также расчетный индекс РНК/ДНК. Этот комплекс показателей стал применяться достаточно давно, однако он не потерял своей значимости до настоящего времени в виду универсальности и относительной простоты [Спирин, 1958; Sutcliffe, 1970; Dortch, Roberts, 1983; Buckley, 1984; Robinson, Ware, 1988; Megurk, Kusser, 1992; Clemmesen, 1994; Juinio, Gobb, 1994; Moss, 1994; Bowen et al., 2005].

7.1. Индикаторы процессов белкового синтеза и ретенции белка у представителей морских *Bivalvia*

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) являются необходимым компонентом при синтезе белка, поэтому можно утверждать, что их суммарное содержание в данный момент (период) жизни отражает скорость синтеза белка: чем выше содержание РНК, тем выше скорость синтеза. Наиболее четко эта закономерность проявляется у молодых и быстрорастущих организмов и у животных, находящихся на самых ранних стадиях онтогенеза [Sutcliffe, 1970; Moss, 1994; Rooker, Holt, 1996]. Концентрация РНК у многих организмов напрямую связана со скоростью роста. К примеру, такая взаимосвязь описана для микроорганизмов [Leick, 1968], некоторых насекомых, копепод, амфипод и других ракообразных [Dagg, Littlepage, 1972; Ota, Landry, 1984; Pease, 1988; Miglavs, Jobling, 1989; Moss, 1994]. За скорость роста принималось, как правило, увеличение сухой массы тела за определенный промежуток времени.

Однако для большого количества таксономических групп животных, в особенности тех, которые характеризуются значительной массой тела, ее прирост логично оценивать по уровню накопления белковых ресурсов, напрямую зависящих от биосинтетических процессов. Для этого необходимо подключать такие показатели, как содержание белка, расчетные индексы – РНК/ДНК, РНК/белок, РНК/сухая масса. Данные по содержанию общего белка можно рассматривать как результирующую процессов анаболизма (Ар) и катаболизма (Кр). В большинстве случаев у животных наблюдается прямая зависимость между содержанием белка и Ар: начальные стадии развития, молодые быстрорастущие особи разных видов [Buckley, 1980; Ota, Langry, 1984; Wright, Martin, 1985; Megurk, Kusser, 1992; Rooker, Holt, 1996], организмы с коротким жизненным циклом и т.д. [Leick, 1968; Dagg, Littlepage, 1972; Dortch, Roberts, 1983]. Однако это прослеживается не всегда, и причина этого – разная интенсивность катаболизма

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

белка. В таких случаях содержание белка является показателем степени сопряженности белкового синтеза и процессов распада белоксодержащих соединений. При анализе же ростовых процессов у морских двустворчатых моллюсков в течение долгосрочных временных интервалов, таких как годовые циклы, связи между этими величинами не обнаруживалось [Щербань, Аболмасова, 1991; Щербань, 1995; Вялова, 2000].

В исследованиях, выполненных на устрицах, голубых мидиях, американских лещах, атлантических видах сельди и окуня было установлено, что индекс РНК/ДНК чувствителен к смене пищевых субстратов и может быть использован как показатель мгновенной скорости белкового синтеза [Hetzel et al., 1983; Wright, Martin, 1985; Robinson, Ware, 1988; Megurk, Kusser, 1992; Clemmesen, 1994 и др.].

Биохимический подход к изучению вопросов роста морских двустворчатых моллюсков в природной среде обитания, так же как и в аквакультуре, всегда был и остается актуальным, несмотря на приоритетность морфометрических методов оценки ростовых процессов. Объектами таких исследований являлись мидии – черноморская *Mytilus galloprovincialis* L. [Дивавин, 1984; Щербань, 1991, 1992, 1995, 2001, 2010; Щербань, Вялова, 2008], калифорнийская *Mytilus californianus* [Clemmesen, 1994; Danlhoff, Menge, 1996; Stillman et al., 1996], устрицы – *Crassostrea viridis* [Hetzel, Wright, 1983 и др.] и *Crassostrea gigas* [Вялова и др., 2008], анадара *Anadara inaequalis* Br. [Щербань, Андреев, 2007; Щербань, 2011], а также мия – *Mya arenaria* [Mayrand et al., 1994] и чилийский гребешок *Argopecten purpuratus* L. [Martinez et al., 1992]. Исследования выполнены и на более редких видах двустворчатых моллюсков, например, *Pecten maximus* и *Nucella ostrina* (трубач) [Martinez et al., 1992; Danlhoff, Menge, 1996; Menge et al., 1999]. Так, суммарное содержание РНК и соотношение РНК/ДНК применялось в качестве экспресс-показателей для оценки интенсивности синтеза белка в соматических и генеративных тканях *Pecten maximus*, а соотношение РНК/ДНК – в комплексе с рядом ключевых показателей энергетического метаболизма: величиной потребленного кислорода, активности цитратсинтетазы, малатдегидрогеназы, для характеристики функционального состояния *Nucella ostrina* [Danhoff, Menge, 1994; Danlhoff et al., 2002]. Установлено, что индекс РНК/ДНК сильно варьирует у изучаемых видов и отражает кратковременные изменения в доступности пищи. Голод, как основной фактор, влияющий на рост и метаболизм, наряду с тепловым стрессом, ограниченным поступлением кислорода и приливно-отливными явлениями приводил к снижению активности ферментов и величины РНК/ДНК у *M. californianus* и *N. ostrina*. Особо чувствительным к пищевому фактору органом оказался мускул-аддуктор, способный аккумулировать значительные количества энергии. Полученные результаты хорошо согласовывались с исследованиями этих же авторов и на других морских беспозвоночных [Danhoff, Menge, 1996; Menge et al., 1999]. Такой подход к комплексной оценке анаболической активности тканей применялся при исследовании двустворчатых моллюсков в аквакультуре [Martinez et al., 1992; Mayrand et al., 1994] и в исследованиях на морских видах рыб [Mathers, Houlihan, 1992; Pelletier et al., 1995; Yang, Somero, 1995].

В Черном море к массовым видам двустворчатых моллюсков могут быть отнесены мидии, митиллястеры и, в перспективе, устрицы, которых неоднократно пытались акклиматизировать в различных районах Крымского побережья еще с 80-

х годов прошлого столетия. В 2007 году, завезенная из питомника северо-атлантического побережья Франции, *Crassostrea gigas* стала объектом марикультуры. Оценка скорости роста ее молоди (спат 2 месяца, длина 6,5 мм) была проведена в условиях морской фермы (пос. Кацивели, Крым) [Вялова и др., 2008]. Интенсивность белкового синтеза у триплоидов оказалась в среднем в 3 с лишним раза выше в зимне-весенний сезон, чем у диплоидов и снижалась к лету. Примененная экспресс-методика позволяла оценить “мгновенную скорость” ростовых процессов и онтогенетические особенности роста разных линий устриц в условиях искусственного выращивания.

Важным аспектом работы с культивируемыми морскими моллюсками является изучение индивидуальной и групповой вариабельности признаков, в особенности тех, которые определяют степень созревания половых продуктов (ПП). Черноморская мидия – наиболее изученный в этом отношении вид двустворчатых [Щербань, Аболмасова, 1991; Щербань, 1992, 1995, 2000, 2010; Вялова, 2000; Щербань, Вялова, 2008 и др.]. Особенности цикла размножения этого вида позволяют создавать отдельно когорты производителей – самцов и самок – и изучать их половые продукты после вымета, до оплодотворения и начала эмбриогенеза. До недавнего времени ощущался дефицит этих данных. Анализ естественных популяций показал, что уровень биосинтеза белка в гонадах самцов и самок на разных временных этапах подготовки к нересту различен. Так, содержание РНК у самцов 3-4 преднерестовой стадии в 1,9 раза ниже, чем в гонадах самцов, готовых к вымету половых продуктов; у самок эти величины различаются в 2,1 раза [Щербань, Вялова, 2008; Караванцева, Щербань, 2010]. Авторы работ показали, что содержание нуклеиновых кислот заметно возрастает по мере созревания гонад от 1 до 4 стадии, достигая максимума на 5 стадии. В условиях температурной стимуляции нереста уровень синтеза белка повышается у самцов в 2 с лишним раза по сравнению с самками, а в условиях природного нереста был одинаков [Караванцева, Щербань, 2010]. Индекс скорости роста РНК/ДНК в гонадах самцов был значительно выше (36,2), чем у самок (5,5). По величинам количественного содержания ДНК в ПП определен предполагаемый объем личиночного материала и оплодотворяющая способность самцов. ПП самцов характеризовались максимально высоким содержанием ДНК, в 8,9 раза выше, чем у самок, иными словами, предположительно на 1 выметанную яйцеклетку приходится 9 выметанных сперматозоидов. Такие данные для этого вида получены впервые [Караванцева, Щербань, 2010]. Более полная характеристика особенностей генеративного синтеза у нескольких основных цветовых морф мидий представлены в работе авторов [Щербань, Вялова, 2008].

В ранних исследованиях на природных популяциях *Mytilus galloprovincialis* (район ЮБК, бухта Ласпи и бухта Казачья, Севастополь) были получены данные по биохимической индикации ростовых процессов в соматической ткани (мантийные лепестки) и гонадах у разновозрастных групп моллюска [Щербань, 1995; 2000]. Результаты сопоставлялись с морфометрическими параметрами – линейными приростами и приростами массы тканей на протяжении нескольких годовых циклов. Анализ собственных и литературных данных по морфологическим критериям роста черноморских мидий, растущих на различных субстратах, включая коллекторные установки, оставлял открытым вопрос о приоритетности влияния тех или иных природных факторов на скорость процессов роста. В

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

результате проведенных исследований на трех видах цветковых морф мидий (черной, темно-коричневой и коричневой) было показано, что между ними существуют достоверные различия в параметрах соматического роста тканей (содержании РНК и белка, значениях индекса РНК/ДНК). Показано, что черная морфа отличается максимальной скоростью роста [Щербань, 2000]. Эта особенность была характерна как для взрослых, так и неполовозрелых мидий.

Среди морских двустворчатых есть виды–вселенцы, расселяющиеся в водоемы с несвойственной ранее для них соленостью, кислородным режимом, структурой биотопов, кормовым ресурсом и т.д. По сравнению с другими группами гидробионтов-вселенцев, такими как желетелье или копеподы, они не так многочисленны. В Черном море одним из таких видов является анадара – *Anadara inaequalvis* Br. Данный моллюск появился в Черном море в конце 80-х годов прошлого столетия и расселился преимущественно на глубинах 7-25 м, позднее был найден и на глубинах 4,0-6,5 м. К настоящему времени исследована тканевая специфика биосинтеза белка в соматических органах этого моллюска, обитающего в природной среде (на примере 3-х размерно-возрастных групп), а также в эксперименте при дефиците пищи [Щербань, Андрееенко, 2007; Щербань, 2011].

На уровне субдоминант в Черном море обитают виды двустворчатых моллюсков, приуроченные к рыхлым грунтам. Они могут входить в состав “поясных” сообществ шельфа или образовывать локальные биоценозы. К таким видам можно отнести *Chamelea gallina*, *Modiolula phaseolina*, *Mutilaster lineatus*, 2 вида рода *Abra*: *A. alba* и *A. nitida*. На настоящий момент исследований по биохимической индикации роста на этих видах не проводилось.

Проводя анализ исследовательских работ по данной тематике, необходимо сказать о том, что подавляющее большинство авторов использовали в качестве основного – показатель РНК/ДНК. Наряду с вышеизложенным, расчетный индекс РНК/ДНК применялся также при оценке скоростей процессов биосинтеза белка и регенерации тканей черноморских двустворчатых моллюсков при воздействии неблагоприятных и экстремальных факторов [Canino, 1994; Stillman et al, 1996; Bowen, 2005; Щербань, 2010]. У черноморских мидий в условиях действия токсических нагрузок: полихлорированные бифенилы (ПХБ) и тетрадецилтриметиламмоний бромида (ТДТМА) – величина полученного индекса характеризовала уровень и направленность белкового синтеза в соматических и генеративных тканях и процессы регенерации в жабрах [Солдатов и др., 2005; Щербань, 2010]. Показано, что величина РНК/ДНК отражала угнетение процессов регенерации в жабрах и свидетельствовала о наличии выраженного токсического эффекта: контрольные значения РНК и РНК/ДНК в разных тканях мидий, неподверженных токсической нагрузке, были значительно выше экспериментальных, за исключением гонад. Содержание РНК и индекс РНК/ДНК в жабрах мидий значительно превышали значения, отмеченные для других тканей, что подтверждало высокую скорость роста и регенерации жаберных структур.

На другом виде (*Anadara inaequalvis*) было показано, что индекс РНК/ДНК может быть использован для оценки скоростей соматического роста тканей наряду с такими показателями белкового анаболизма, как содержание свободных нуклеотидов (СН), аминокислот (АК), РНК и общего белка в условиях внешней аноксии [Андрееенко и др., 2009а, 2009б; Щербань, 2011]. На основании

комплекса показателей было установлено, что в условиях действия внешней аноксии снижалась активность белкового анаболизма в жабрах и гепатопанкреасе этого моллюска и активировались процессы белкового катаболизма.

Отметим, что кроме величин суммарного содержания РНК, общего белка и индекса РНК/ДНК, для характеристики скорости роста организмов применяются и такие биохимические расчетные показатели, как белок/сухая масса, РНК/сухая масса, РНК/белок [Buckley, 1980; Hetzel, Wright, 1983; Щербань, 1992; Mayrand, Pellerin-Massicotte, 1994; Щербань, 1995]. Однако они используются значительно реже и рассматриваются как дополнительные.

Главными аспектами приложения рассмотренных выше показателей в гидробиологической практике могут быть следующие.

1. Использование расчетной величины РНК/ДНК в качестве индикаторного индекса «мгновенной» скорости роста на ранних стадиях развития организмов.

2. Использование расчетного индекса РНК/ДНК, величин РНК и белка при характеристике особенностей белкового синтеза в связи с периодами годовых жизненных циклов; в оценке тканевых и онтогенетических особенностей этих процессов.

3. Применение величины РНК/ДНК в качестве индекса пищевого стресса (пищевой обеспеченности).

4. Применение индекса РНК/ДНК, величины РНК и белка при оценке биосинтеза и роста у организмов (особей) в популяциях, находящихся в разных экологических условиях, для выявления элементов сходства и различия в скоростях этих процессов.

5. Учет основных индикаторов роста (величины РНК и РНК/ДНК) в практике современных марихольств для прогнозирования наиболее благоприятных периодов сбора культивируемых видов двустворчатых моллюсков.

6. Анализ тканевой специфики белкового синтеза у гидробионтов в условиях действия неблагоприятных и экстремальных факторов с помощью расчетного индекса РНК/ДНК и величины РНК для оценки их негативного влияния.

7. Применение указанных параметров в комплексе с другими физиолого-биохимическими показателями для интерпретации общего и белкового метаболизма изучаемых объектов.

7.2. Процессы синтеза белка в тканях моллюсков

В настоящем разделе представлена информация о скоростях пластического роста в соматических и генеративных тканях у *Mytilus galloprovincialis* и *Anadara inaequalis* с учетом условий среды и функциональных состояний моллюсков.

7.2.1. Цветовой полиморфизм раковин и особенности белкового синтеза в соматических и генеративных тканях *M. galloprovincialis*

Материал для исследования получен в мае 1998 г. Моллюски были собраны с коллекторов, расположенных в бухте Казачья (г. Севастополь). Отбирали одноразмерных половозрелых моллюсков с длиной раковины $40 \pm 1,5$ мм, одного

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

срока оседания, с черной (Ч), коричневой (К) и темно-коричневой (Т-К) раковиной. Стадию зрелости гонад оценивали по пятибалльной шкале [Финенко и др., 1990]. Для анализа отбирали моллюсков с гонадами 3-4 стадий развития. Из свежельвовленных мидий извлекали ткани – соматическую (реснитчатый край мантии) и генеративную (мантийные лепестки). У каждой особи первоначально измеряли длину, определяли сырую и сухую массу тела и гонад. Скорость роста оценивали по содержанию белка, суммарного количества РНК, ДНК и индексу РНК/ДНК. Все пробы индивидуальны: каждому измерению соответствовал 1 экз. моллюска.

Среди фенотипических групп черноморских мидий наблюдаются существенные различия по показателям «мгновенной» скорости роста. Наибольшей «мгновенной» скоростью обладают моллюски Ч фенотипа, а наименьшей – К.

У мидий с раковиной черного цвета получены максимально высокие значения содержания РНК по сравнению с мидиями темно-коричневого и коричневого фенотипов – соответственно $1,27 \pm 0,12$; $0,35 \pm 0,06$ и $0,26 \pm 0,01$ % (рис. 7.1, 7.2). Содержание белка в гонадах мидий Ч фенотипа также было достоверно выше, чем у двух других групп, и составляло в среднем $27,83 \pm 0,38$ %. Для сравнения: темно-коричневый фенотип – $23,90 \pm 1,55$ %, коричневый – $16,08 \pm 0,45$ %. Сходные различия обнаружены и в величинах индекса РНК/ДНК (рис. 7.3).

Ранее мы установили, что общий тканевой гомогенат, полученный от сеголеток мидий сравниваемых цветовых морф, имеет те же фенотипические особенности, что и тканевые гомогенаты половозрелых моллюсков [Щербань, 1999].

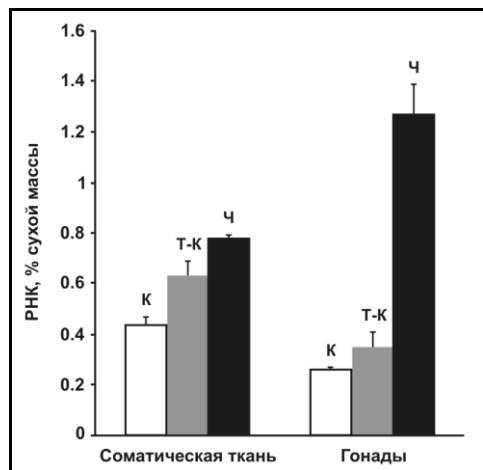


Рис. 7.1. Содержание РНК в соматической ткани и гонадах мидий трех фенотипических групп

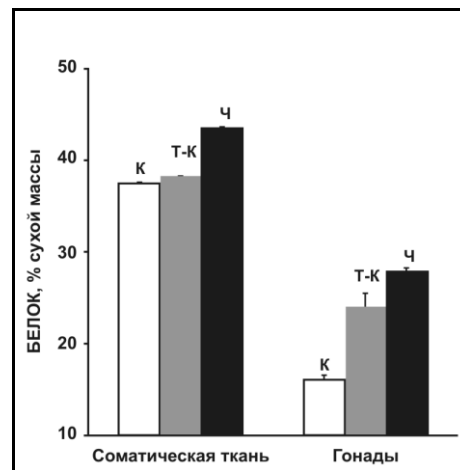


Рис. 7.2. Содержание белка в соматической ткани и гонадах мидий трех фенотипических групп

Уровень содержания белка в мантии был значительно выше ($p < 0,05$), чем в гонадах. Такая закономерность прослеживается по каждой из трех фенотипических групп (рис. 7.2). Однако уровень РНК отличался несущественно у фенотипов К и Т-

К. Достоверность различий получена только для Ч фенотипа. В целом анаболическая активность гонад, оцениваемая по содержанию РНК и белка, у двух из трех изученных морф К и Т-К мидий оказалась низкой.

Таким образом, содержание белка и РНК (К, Т-К) в мантии было выше, чем в гонадах, что свидетельствует о более высокой ее анаболической активности. Наиболее выраженной скоростью соматического роста обладают ткани моллюсков черной цветовой морфы, а наименьшей – коричневой морфы.

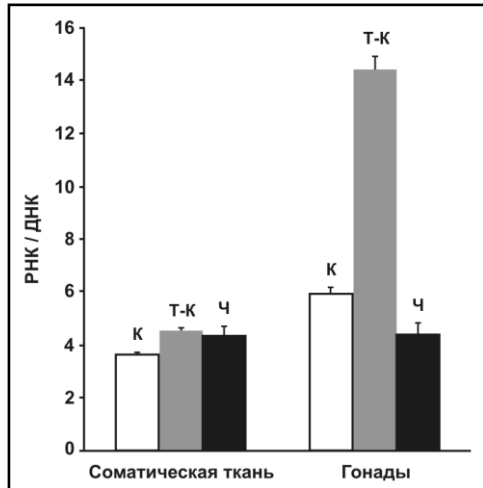


Рис. 7.3. Величина индекса РНК/ДНК в соматической ткани и гонадах мидий трех фенотипических групп

7.2.2. Особенности белкового синтеза в генеративной ткани у *M. galloprovincialis* на протяжении репродуктивного периода

В вопросах структурно-функционального разнообразия популяций гидробионтов немаловажную роль играет изучение процессов белкового роста генеративной ткани [Nawkirk, 1980; Столбова и др., 1996; Щербань, 2000; Пиркова и др., 2002]. На настоящий момент ощущается дефицит данных о состоянии и изменчивости ростовых характеристик тканей и гонад, в частности у *M. galloprovincialis*, в зависимости от пола и стадий зрелости гонад моллюсков [Петкевич, Вялова, 2005]. Этому аспекту проблемы и посвящен настоящий подраздел.

Моллюсков собирали в период с марта по июнь 2004-2005 г.г. с коллекторов частного мидийного хозяйства, расположенного в бухте Стрелецкая (г. Севастополь). Отбирали особей с раковиной 50–55 мм, имеющих гонады на различных стадиях зрелости, которую оценивали по пятибальной шкале, включая период резорбции [Иванов и др., 1981; Финенко и др., 1990; Столбова, Пиркова, 1995]. Скорость соматического роста контролировали по содержанию РНК.

Для черноморских мидий характерна индивидуальная асинхронность созревания гонад [Финенко и др., 1990], поэтому в популяции могут одновременно встречаться особи с разной зрелостью гонад. Так, в марте доля самок на 3-4 стадии составляла 33 % и самцов на той же стадии – 40 %, а в июне их количество увеличилось до 60 и 73 % соответственно. Число резорбирующих самок (5-я стадия) было незначительным (11-18 %) за весь период исследования. В июне отмечены особи с гонадами, находящимися в стадии покоя (~14 %). Анализ данных по содержанию РНК показал, что гонады моллюсков характеризуются разным уровнем синтетической активности в зависимости от готовности к нересту (табл. 7.1).

Содержание нуклеиновых кислот заметно возрастало по мере созревания гонад, достигая максимальных значений на 5 стадии. Известно, что на момент нереста гонады мидий обладают максимальной сухой массой, где доля белка может достигать 60 % [Финенко и др., 1990]. При окончательном созревании гонад и

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

готовности к нересту содержание РНК продолжает оставаться высоким. Поскольку у мидий нерестовый период, в течение которого происходит многократный вымет половых продуктов, достаточно длителен (до 30-60 суток), то и процессы биосинтеза продолжают оставаться на максимально высоком уровне до полного опустошения гонад. Анализ результатов показал, что достоверных различий между содержанием РНК в гонадах самок и самцов не обнаружено ($p > 0,05$).

Таблица 7.1

Содержание РНК ($\mu\text{кг мг}^{-1}$ сухой массы) в гонадах черноморских мидий в весенне-летний период

Стадия зрелости гонад	Самки			Самцы		
	$M \pm m$	CV	n	$M \pm m$	CV	n
1	$3,30 \pm 0,15$	12,1	7	$3,90 \pm 0,10$	10,1	7
2	$4,49 \pm 0,17$	14,4	15	$4,49 \pm 0,21$	13,3	8
3-4	$6,92 \pm 0,70$	37,7	14	$7,94 \pm 0,25$	10,6	11
5	$15,01 \pm 1,27$	29,4	12	$15,60 \pm 2,04$	41,	10
6	$5,50 \pm 0,3$	8,1	11	–	–	–

Примечание: «←» данные отсутствовали

В гонадах, как самок, так и самцов, вариабельность значений РНК была незначительной на ранних стадиях зрелости ($CV = 10-14\%$). По мере роста и созревания коэффициент вариации заметно увеличивался. При определении 3-й и 4-й стадий существуют некоторые трудности, так как в гонадах одной особи могут встречаться половые клетки разной зрелости. В данном случае нами были объединены результаты, полученные для двух преднерестовых стадий, что, очевидно, и отразилось на высоких значениях коэффициента вариации. Высокая степень изменчивости содержания РНК в гонадах самцов ($CV = 41,4\%$) и самок ($CV = 29,4\%$) на 5-й стадии, по-видимому, связана с различной интенсивностью нереста каждого из моллюсков, когда уровень белкового анаболизма становится зависимым от физиологического состояния организма.

В весенне-летний период исследуемая популяция мидий состояла на 36 % из мидий черного фенотипа, 34 % – черно-коричневого и 29 % из моллюсков коричневого фенотипа. У мидий с черными и черно-коричневыми створками в содержании РНК в генеративной ткани достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$) (рис. 7.4). Однако на 5-й стадии зрелости у моллюсков коричневой морфы уровень данных соединений был значительно выше и достоверно отличался от других фенотипов ($p < 0,02$).

В последнее время в популяциях черноморской мидии все чаще стали встречаться экземпляры, лишенные интенсивной окраски раковины, края мантии и ноги (депигментированные особи). По нашим данным, они составляют менее 0,1 % всей популяции. На момент проведения исследования эти моллюски находились на 3-4 стадии зрелости и в подавляющем количестве были представлены женскими особями (до 90 %). Полученные результаты показали, что содержание нуклеиновых кислот в генеративных тканях депигментированных особей несколько выше ($p < 0,05$) по отношению к особям, имеющим черную или коричневую окраску раковины (рис. 7.5).

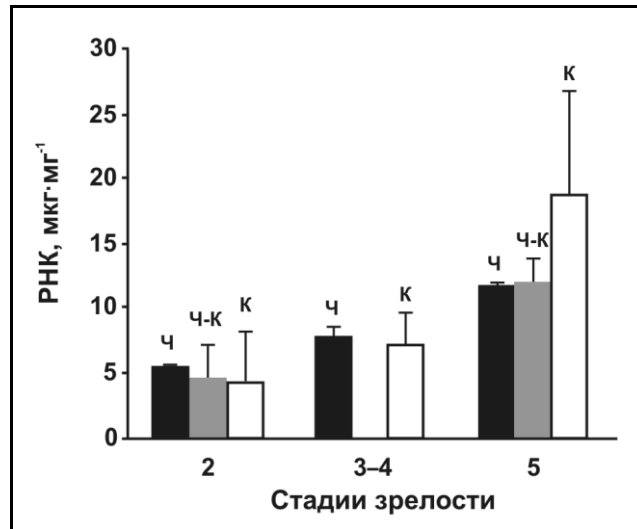


Рис. 7.4. Содержание РНК в гонадах самок мидий на различных стадиях репродуктивного цикла

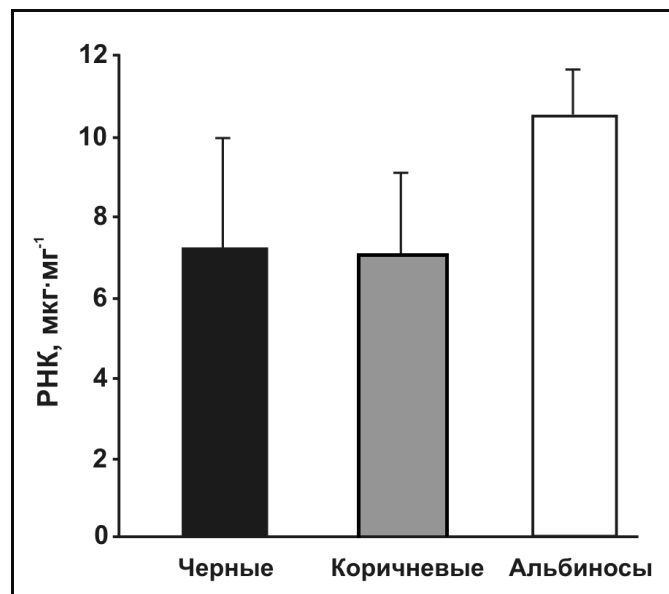


Рис. 7.5. Содержание РНК в гонадах самок мидий различных цветовых морф

Таким образом, результаты настоящих исследований свидетельствуют о том, что процессы синтеза белка в гонадах черноморских мидий зависят от степени готовности их к нересту. Не обнаружены различия в уровне РНК в генеративной ткани между самцами и самками, а также особями с различной пигментацией створок раковины, за исключением моллюсков коричневого фенотипа на 5-й стадии. Впервые получены результаты по содержанию РНК в гонадах мидий с депигментированными тканями.

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

7.2.3. Сравнительный анализ содержания нуклеиновых кислот в гонадах и половых продуктах *M. galloprovincialis*

Сравнительно недавно черноморские мидии составляли значимую часть биоресурсов Черного моря. Однако в последние годы численность их значительно снизилась в силу ряда причин, и добывать их становится нецелесообразно. Единственным путем решения проблемы является их искусственное воспроизводство – марикультура. Эти технологии базируются на сборе молоди (спата) в природе от мидий, нерестящихся естественным путем. Возможна также организация полноциклических хозяйств, позволяющих получать личинок в условиях питомников.

Данные о содержании РНК и ДНК в генеративных тканях ограничены [Петкевич, Вялова, 2005], а в выметанных половых продуктах (ВПП) – отсутствуют. Восполнить этот пробел и является целью настоящей работы.

Две группы моллюсков были взяты с капроновых коллекторов мидийной фермы в бухте Ласпи (Южный берег Крыма), с глубины 2 м в феврале и апреле 2009 года. Средний линейный размер раковины – $6,1 \pm 0,4$ см. Пол и стадию зрелости гонад определяли по 5-ти бальной шкале [Иванов и др., 1981]. Нерест стимулировали по методике теплового шока [Pennec, 1981; Newel, Thompson, 1984]. Продолжительность нереста составляла 4-6 часов. Половые продукты отбирали дозатором в центрифужные пробирки и осаждали многократным центрифугированием при 4000 об мин^{-1} , удаляя примеси и морскую воду. У отнерестившихся мидий брали навески гонад. Каждую пробу в отдельности (суспензированные сперматозоиды и яйцеклетки, а также посленерестовые гонады) фиксировали раствором Фолча и в дальнейшем подвергали биохимическому анализу на содержание нуклеиновых кислот (РНК, ДНК). Технологическая схема представлена на рисунке 7.6.

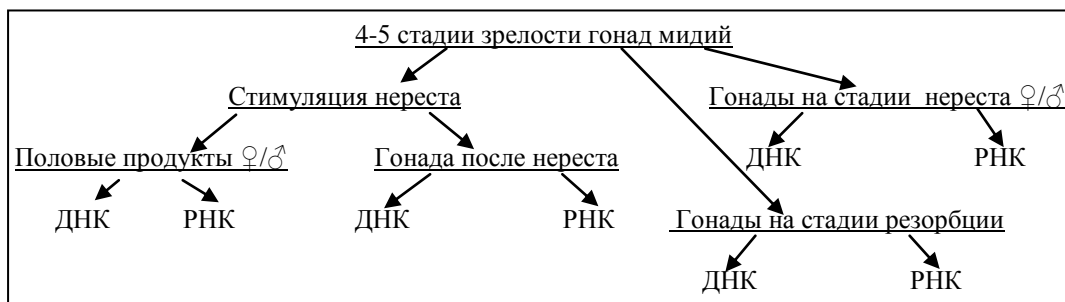


Рис. 7.6. Технологическая схема отбора образцов генеративной ткани у мидий в период нереста

Результаты 2-х экспериментальных серий представлены в таблице 7.2. Установлено, что гонады самцов и самок, находящиеся на 4–5 стадиях (после искусственной стимуляции нереста) и ВПП характеризуются разной интенсивностью репродуктивного биосинтеза. Посленерестовые гонады отличаются заметно более высоким уровнем РНК. У самцов он был в 11,6 раза, а у самок – в 1,5 раза выше по сравнению с ВПП. Индекс РНК/ДНК, часто используемый как показатель высокой анаболической активности, в гонадах

самцов был значительно выше (36,13), чем у самок (5,48). Содержание же РНК в гонадах самок, напротив, была в 2,1 раза выше, чем у самцов.

ВПП самцов характеризуются максимально высоким содержанием ДНК ($3,39 \pm 0,33$ мкг·мг⁻¹), что в 8,9 раз превышали значения, зарегистрированные для самок. В основе различий лежат размеры гамет: яйцеклетки значительно крупнее.

Таблица 7.2

Содержание РНК, ДНК и индекса РНК/ДНК в простимулированных гонадах и половых продуктах черноморских мидий ($M \pm m$)

Пол	РНК, мкг·мг ⁻¹		ДНК, мкг·мг ⁻¹		РНК/ДНК	
	ВПП	Гонады	ВПП	Гонады	ВПП	Гонады
Самцы	$0,84 \pm 0,06$ (1)	$11,70 \pm 2,07$ (2)	$3,39 \pm 0,33$ (1)	$0,36 \pm 0,07$ (2)	$0,25 \pm 0,02$ (1)	$36,13 \pm 6,58$ (2)
Самки	$8,27 \pm 1,12$ (1)	-	$0,38 \pm 0,03$ (1)	-	$22,06 \pm 2,44$ (1)	-
	$2,61 \pm 0,10$ (2)	$5,45 \pm 0,55$ (2)	$0,37 \pm 0,03$ (2)	$0,94 \pm 0,19$ (2)	$7,05 \pm 0,60$ (2)	$5,48 \pm 0,99$ (2)

Примечание: 1 – 4 стадия зрелости; 2 – 5 стадия зрелости

Известно, что на момент нереста гонады имеют максимальную сухую массу, где доля белковых фракций может достигать 60 %. Ранее было показано, что содержание нуклеиновых кислот заметно возрастает по мере созревания гонад (от 1 до 4 стадии), достигая максимальных значений на 5 стадии [Щербань, Вялова, 2008]. Анализ естественных популяций показал, что содержание РНК у самцов 3-4 преднерестовой стадии в 1,9 раза ниже, чем в гонадах самцов, готовых к вымету (5 стадия, без стимуляции); у самок эти различия составляют 2,1 раза (табл. 7.3).

Таблица 7.3

Содержание РНК (мкг·мг⁻¹ сухого веса) в гонадах и половых продуктах мидий

Стадии зрелости	Самки		Самцы	
	$M \pm m$	CV	$M \pm m$	CV
3-4 (преднерестовая)	$6,92 \pm 0,70$	37,7	$7,94 \pm 0,25$	10,6
4-5 (стимуляция)	$5,45 \pm 0,55$	20,3	$11,70 \pm 2,07$	39,5
5 (стадия нереста)	$15,01 \pm 1,27$	29,4	$15,60 \pm 2,04$	41,0
6 (стадия резорбции)	$5,50 \pm 0,30$	8,1	-	-
ВПП	$8,27 \pm 1,12$	40,8	$0,84 \pm 0,06$	18,9
	$2,61 \pm 0,10$	-	-	-

Достаточно высокая изменчивость показателя на 5 стадии связана, по-видимому, с различной интенсивностью естественного нереста каждого из моллюсков, когда уровень белкового анаболизма становится зависимым от физиологического состояния организма. После вымета наступают процессы резорбции с последующей регенерацией тканевых структур. Уровень содержания РНК в резорбирующихся гонадах самок из естественных популяций не отличался от уровня в гонадах, полученных путем стимуляции (табл. 7.3). Самцов на данной стадии зрелости гонад не исследовали.

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

Анализ данных по содержанию ДНК в гонадах самцов и самок, неподверженных температурной стимуляции, не выявил статистически значимых различий (табл. 7.4). Получены незначительные отличия в величинах на стадии естественного природного нереста: $1,40 \pm 0,08$ мкг·мг⁻¹, $1,70 \pm 0,10$ мкг·мг⁻¹, при низких CV коэффициентах (5,4 и 8,8). В простимулированных гонадах, напротив, различия между полами достигали более чем 2 раза.

Количество ДНК в ВПП самцов было в среднем в 9 раз выше, чем у самок. Это, как уже отмечалось, объяснимо более мелкими размерами сперматозоидов и, как следствие, более высокой их численностью в навеске семенников.

Можно предположить, что резорбирующие гонады самок природных популяций, в результате длительного порционного выброса гамет, оказываются более опустошенными, вследствие чего они содержат небольшое количество единичных яйцеклеток и сопутствующих амебоцитов. Величина содержания ДНК в таких гонадах должна быть более низкой (табл. 7.4).

Таблица 7.4

Содержание ДНК (мкг·мг⁻¹) в гонадах и половых продуктах мидий разного пола

Стадии зрелости	Самки		Самцы	
	M±m	CV	M±m	CV
3-4 (преднерестовая)	$0,45 \pm 0,06$	< 10	$0,51 \pm 0,06$	< 10
4-5 (стимуляция)	$0,94 \pm 0,19$	49,6	$0,36 \pm 0,07$	43,9
5 (стадия нереста)	$1,40 \pm 0,22$	5,4	$1,70 \pm 0,57$	8,8
6 (стадия резорбции)	$0,35 \pm 0,07$	31,8	-	-
ВПП	$0,38 \pm 0,03$	25,6	$3,39 \pm 0,33$	27,8
	$0,37 \pm 0,03$	25,5	-	-

Таким образом, интенсивность репродуктивного синтеза различна в гонадах 3-4, 4-5 стадий зрелости. В последнем случае она существенно выше. Это наблюдалось как в естественных, так и экспериментальных (стимуляция) условиях и было характерно для обоих полов. При этом отмечена достаточно высокая вариабельность величин внутри выборок. В гонадах, подверженных стимуляции, уровень белкового синтеза у самцов выше в 2,1 раза, чем у самок, а в условиях природного нереста – одинаков. Индекс РНК/ДНК в выметанных искусственным путем сперматозоидах в 88 раз ниже, чем в яйцеклетках. В опустошенных тканевых структурах простимулированных гонад самцов этот показатель в 6,6 раза выше, чем у самок, что свидетельствовало о более интенсивном процессе белкового синтеза. ВПП самцов характеризовались максимально высокими показателями содержания ДНК ($3,39 \pm 0,33$ мкг·мг⁻¹, в 8,9 раза выше, чем у самок).

7.2.4. Особенности белкового синтеза в соматических тканях двустворчатого моллюска-вселенца *A. inaequalvis*

Особенности пластического роста и регенерации тканей анадара практически не исследованы. Известно, что анадара растет значительно медленнее других видов двустворчатых, таких как мидии и устрицы [Щербань, 2000;

Вялова и др., 2008; Стадниченко, Золотарев, 2009]. После оседания за 2-2,5 года она может достигать размеров 14-20 мм [Ревков и др., 2002]. Средний размер раковины – 11-30 мм [Gomoiu, 1984; Стадниченко, Золотарев, 2009]. В этой связи становятся актуальными исследования, связанные с изучением особенностей соматического роста тканей этого вида, тем более что его рассматривают в качестве перспективного объекта марикультуры в Черноморском регионе.

В настоящем разделе представлена информация об особенностях соматического роста тканей различных размерно-возрастных групп анадары из естественных поселений, а также в условиях ограничения питания моллюска.

Размерно-возрастные группы анадары. Работа выполнена на взрослых особях анадары с длиной створки раковины 14-27 мм. Моллюски были разделены на 3 размерно-возрастные группы: с длиной створок 14-17, 17-22, 22-27 мм. Предположительный возраст их составил 2,5; 3 и 3,5 года [Стадниченко, Золотарев, 2009].

Уровень РНК в жабрах, мантии и гепатопанкреасе составлял 13-16 мкг мг⁻¹ сухой ткани (размерная группа 17–22 мм) (рис. 7.7). В ноге он был в 2,0-2,5 раза ниже. При этом с увеличением размеров моллюска (размерная группа 22–27 мм) в гепатопанкреасе и мантии отмечали снижение содержания РНК более чем в 2,0 раза. В остальных случаях (жабры, нога) различия не были статистически выражены. Для сравнения: в жабрах и гепатопанкреасе мидий, близких по возрастным характеристикам к группе 22–27 мм, содержание РНК было в среднем в 1,8-4,5 раза ниже [Щербань, 2000; Щербань, Вялова, 2001].

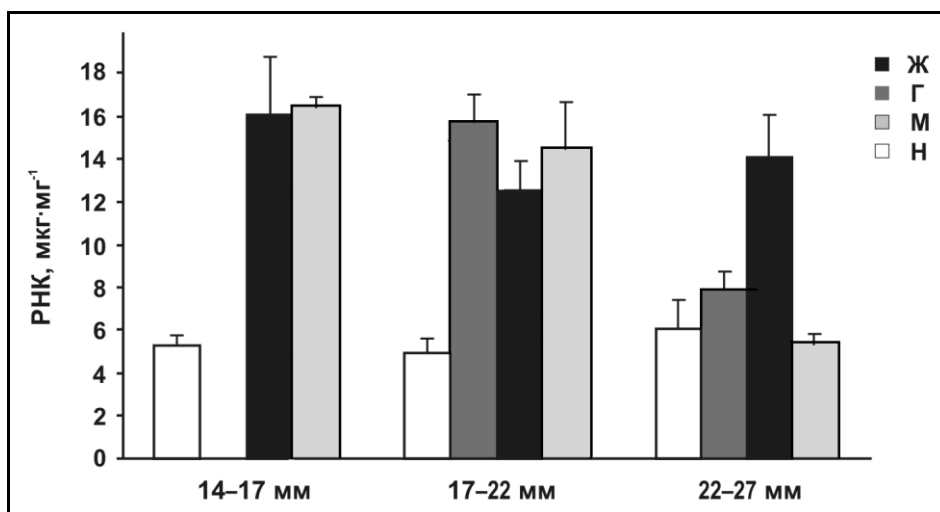


Рис. 7.7. Содержание РНК в тканях анадары в естественных условиях (Н – нога, Г – гепатопанкреас, Ж – жабры, М – мантия)

Анаболическую активность тканей оценили также по величине индекса РНК/ДНК. Результаты представлены в таблице 7.5. Они свидетельствуют о высокой интенсивности этих процессов в жабрах и мантийной ткани – наиболее подверженных механической и химической нагрузке при вентиляции мантийной полости. Эта особенность была лучше всего выражена у более мелких моллюсков. Самые низкие значения индекса были получены для гепатопанкреаса.

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двусторчатых...

Таблица 7.5

Значения индекса РНК/ДНК в тканях разноразмерных групп анадары ($M \pm m$, $n=6$)

Ткани	Размерно-возрастные группы		
	14-17 мм	17-22 мм	22-27 мм
Жабры	$9,67 \pm 0,68$	$5,60 \pm 0,15$	$6,44 \pm 0,33$
Мантия	$8,12 \pm 0,42$	$6,94 \pm 0,34$	$3,93 \pm 0,06$
Гепатопанкреас	-	$3,75 \pm 0,13$	$2,72 \pm 0,03$
Нога	$4,90 \pm 0,73$	$4,87 \pm 0,43$	$4,34 \pm 0,26$

Примечание. n – количество особей

Таким образом, в естественных условиях существования процессы белкового синтеза у анадары имели выраженную тканевую специфику. Наиболее высокая анаболическая активность была свойственна жабрам и мантии моллюска. Это особенно хорошо было выражено у мелкоразмерных особей (14-17 мм). С увеличением размеров (22-27 мм) отмечали угнетение скоростей соматического роста в ряде органов (гепатопанкреас, мантия). Для ноги моллюска это не было свойственно.

Голодание. Полученные результаты позволяют констатировать, что динамика изменения скоростей белкового синтеза у моллюска в условиях депривации пищи имела выраженную тканевую специфику.

Содержание РНК в жабрах на протяжении 15-ти суток голодания фактически не изменялось (рис. 7.8). В то же время в ноге отмечали снижение значений этой величины в 1,3 раза ($p < 0,05$) Это косвенно позволяет говорить о некотором угнетении анаболических процессов в этом органе.

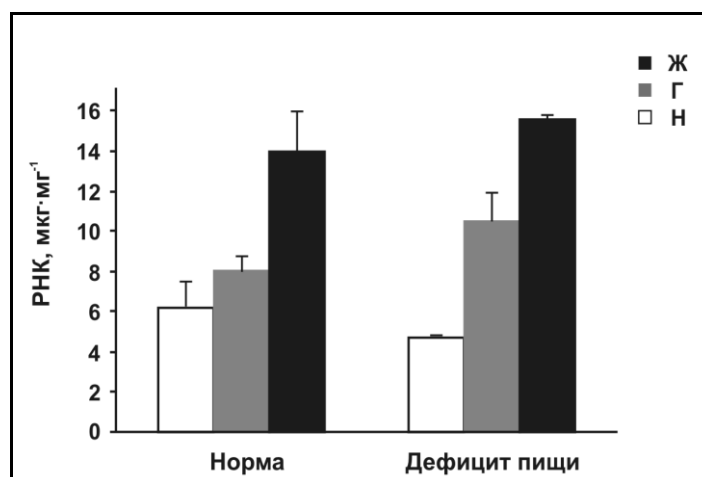


Рис. 7.8. Содержание РНК в тканях анадары в условиях нормы и дефицита пищи (Н – нога, Г – гепатопанкреас, Ж – жабры)

Известно, что дефицит пищи обычно приводит к снижению пластических ресурсов (таких как аминокислоты и белки) тканей животных. Подавляются анаболические процессы в ткани, о чем косвенно свидетельствует снижение значений индекса РНК/ДНК [Gabbott, 1976; Шульман и др., 1993; Rooker, Holt,

1996; Щербань, Вялова, 2001; Bowen et al., 2005]. Проведенные исследования активности ряда ферментов углеводного и белкового обмена, а также содержания белковых метаболитов в тканях анадары в условиях голода показали, в частности, что уровень белка в жабрах понижался в первые 6 дней голодания на 21 % и затем не претерпевал статистически значимых изменений [Андреенко и др., 2009б]. По данным этих же авторов, отмечено уменьшение содержания аминокислот как в жабрах, так и в ноге анадары.

Динамика процессов в гепатопанкреасе имела свою специфику. Сравнение уровня РНК и величин индекса РНК/ДНК у контрольной и опытной групп показало некоторый рост первой величины с $7,81 \pm 0,71$ до $9,60 \pm 0,90$ мкг мг⁻¹ сухого веса, а индекса РНК/ДНК с 2,72 до 10,4.

Специфичность реакции гепатопанкреаса на голод подтверждена и рядом других показателей, прямо и косвенно связанных с направленностью процессов биосинтеза и его конечным продуктом. Как оказалось, процесс адаптации анадары к голоду шел по пути активного использования резерва аминокислот печени, о чем свидетельствует рост активностей аминотрансфераз и значительное повышение в этом органе активности одного из лизосомальных ферментов – катепсина D [Андреенко и др., 2009а, б].

Таким образом, недостаток пищи на определенном промежутке времени (15 суток) не оказывал существенного влияния на процессы биосинтеза белка в тканях анадары. В жабрах при дефиците пищи изменения не были выражены. В гепатопанкреасе, при этих же условиях, уровень РНК несколько возрос. Наиболее чувствительной оказалась ткань ноги. Ее анаболическая активность снижалась в 1,3 раза.

7.3. Тканевая специфика белкового синтеза у двустворчатых моллюсков в условиях экспериментальной гипоксии и аноксии

В литературе по биоэнергетике морских беспозвоночных имеются данные, свидетельствующие об использовании белков в аэробных и анаэробных условиях в качестве энергетических субстратов, в частности у моллюсков [Шульман, 1982; Шапиро, Звездовская, 1986; Шульман и др., 1993; Вялова, 2000]. В связи с этим представляется целесообразным изучение скоростей пластического роста соматических тканей в условиях внешнего дефицита кислорода.

7.3.1. Особенности белкового синтеза в соматических тканях *M. galloprovincialis* под влиянием краткосрочной гипоксии

Материалом служили половозрелые мидии черной морфы с длиной створок раковины 40-42 мм. Моллюсков рассаживали в респирометры объемом 1 л по 8 экземпляров в каждый. Экспозиция составляла 1 и 4 суток. Исходное содержание кислорода в воде – 5,71 мл л⁻¹, остаточное – 1,2 мл л⁻¹ (1 сутки) и 0,38 мл л⁻¹ (4 сутки). Контролем служила группа мидий, сидящих в проточном аквариуме. Параллельно контролировали содержание аммонийного азота. Температура воды – 17-18⁰С.

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

При односуточной гипоксии содержание белка в жабрах и гепатопанкреасе достоверно уменьшалось ($p < 0,05$) (табл. 7.6). Аналогичные результаты получены и для РНК. В содержании ДНК достоверных различий не обнаружено. Значения индекса РНК/ДНК после аутогенной гипоксии понижались в обеих тканях. Статистически значимые различия были получены только в отношении жабр ($p < 0,05$).

Таблица 7.6

Содержание белка, нуклеиновых кислот (РНК, ДНК) в соматических тканях мидии в условиях аутогенной гипоксии ($M \pm m$)

Показатели	Ткань	
	Жабры	Гепатопанкреас
Белок, % сырой массы		
контроль	12,09±1,03	9,60±0,61
1 сут. гипоксии	7,82±0,80	6,93±0,95
контроль	11,10±1,70	–
4 сут. гипоксии	7,7±0,54	–
РНК, % сухой массы		
контроль	3,11±0,34	4,24±0,51
1 сут. гипоксии	2,10±0,40	2,86±0,22
контроль	3,92±0,51	–
4 сут. гипоксии	2,60±0,30	–
ДНК, % сухой массы		
контроль	1,12±0,33	0,88±0,10
1 сут. гипоксии	1,33±0,10	0,78±0,07
контроль	0,50±0,11	–
4 сут. гипоксии	0,50±0,06	–
РНК/ДНК		
контроль	3,53±0,27	4,14±0,30
1 сут. гипоксии	1,59±0,08	3,64±0,70
контроль	7,91±0,82	–
4 сут. гипоксии	5,98±0,31	–

В эксперименте с четырехсуточной гипоксией анализировали данные, полученные только для жаберной ткани. В сравнении с контролем содержание белка и РНК в них снизилось в среднем на 30 % ($p < 0,05$), уровень ДНК остался без изменений. Такое соотношение процессов обусловило уменьшение значений индекса РНК/ДНК на 25 % ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что содержание мидий в указанных выше условиях сопровождалось значительным повышением содержания аммонийного азота в воде респирометра: 5,9 мгк л⁻¹ (контроль) и 91,44 мгк л⁻¹ (опыт).

В обоих экспериментах уже через 4-5 часов мидии начинают испытывать дискомфорт, обусловленный как низким содержанием кислорода в воде, так и накапливающимися продуктами азотистого обмена, как правило, блокирующими доступ кислорода к тканям [Шульман и др., 1993]. Следует указать, что для *Mytilus galloprovincialis* аналогичных линейных размеров при соответствующих температурах воды пороговыми являются концентрации 1,0-1,5 млО₂ л⁻¹, а

переключение на анаэробные процессы метаболизма происходит при $0,5 \text{ млО}_2 \text{ л}^{-1}$ [Шапиро, Звездовская, 1986; Боровинский, 1987]. Количество аммонийного азота в воде респирометра после 4-х суточной экспозиции увеличилось многократно (в 15-16 раз). Отсюда не понятно, какой из факторов: дефицит кислорода или повышенная концентрация аммонийного азота в воде, в условиях аутогенной гипоксии оказывается ведущим.

Использование белков как энергетических субстратов в гипоксических условиях у разных видов мидий обнаружено в более ранних исследованиях [Gabbot, 1976; Шапиро, Звездовская, 1986]. Интенсивность белкового катаболизма оценивают по уровню экскреции его конечных азотистых продуктов (в основном аммонийного азота). В наших экспериментах по окончании 4-х суточной гипоксии наблюдали значительное увеличение (в 15,5 раз) содержания аммонийного азота в воде. Кроме того, известно, что белок может использоваться как энергетический субстрат и в условиях нормального (для данного вида) снабжения кислородом. Известно, что это характерно для гидробионтов ведущих прикрепленный образ жизни [Шульман и др., 1993]. Данный факт важен для объяснения того, что в нашем эксперименте снижение содержания белка наблюдалось как при концентрации кислорода в воде $0,38 \text{ мл л}^{-1}$ (4-х суточная гипоксия), так и при концентрации $1,2 \text{ мл л}^{-1}$ (~32 % насыщения кислородом). Вероятно, могло произойти и дальнейшее уменьшение содержания белка, если продолжительность гипоксии увеличить до 7-10 суток.

Снижение концентрации РНК в среднем на 30 % по сравнению с контрольными величинами отмечали в жабрах и гепатопанкреасе мидий в обоих экспериментах. Одновременно происходило уменьшение значений индекса РНК/ДНК в 2,2 раза (для жабр) при односуточной гипоксии и в 1,3 раза при четырехсуточной, что свидетельствует о замедлении белкового синтеза в условиях дефицита кислорода.

7.3.2. Тканевые особенности белкового анаболизма у *A. inaequalvis* в условиях экспериментальной аноксии и голодания

Технологии постановки экспериментов по изучению влияния аноксии и голодания на организм *A. inaequalvis* подробно описаны в разделах 4.3, 4.4. В таблице 7.7 и на рисунке 7.9 представлены результаты, характеризующие анаболические процессы в организме анадары в условиях экспериментальной аноксии.

В контрольных сериях максимальные величины СН и РНК отмечены в жабрах и гепатопанкреасе; АК пул – в гепатопанкреасе. Минимальные значения были характерны для ноги.

В условиях аноксии в жабрах анадары наблюдали снижение содержания СН, РНК и белка в 1,2-3,4 раза. Особенно заметно было снижение индекса РНК/ДНК. В гепатопанкреасе уровень СН и РНК не изменялся, тогда как пул свободных АК возрастал в 1,2 раза ($p < 0,05$), на фоне снижения содержания белка. Такое соотношение показателей свидетельствует о замедлении процессов белкового синтеза и усилении белкового катаболизма. Полученные результаты в целом совпадают с рассмотренными ранее для *M. galloprovincialis* (подраздел 7.3.1).

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

Таблица 7.7

Содержание свободных нуклеотидов (СН), нуклеиновых кислот, аминокислотного пула (АК) и белка в тканях *A. inaequalvis* в условиях аноксии ($M \pm m$)

Условия опыта	СН, мкг мг ⁻¹	РНК, мкг мг ⁻¹	ДНК, мкг мг ⁻¹	РНК/ДНК	АК, нг мг ⁻¹	Белок, мкг мг ⁻¹
Жабры						
Нормоксия	1,95±0,18	15,5±1,9	0,8±0,06	19,3	199,0±25	47,2±2
Аноксия	0,57±0,05	9,0±1,2	1,4±0,10	6,4	337,1±29	38,0±4
Гепатопанкреас						
Нормоксия	1,51±0,09	10,4±1,5	1,0±0,10	10,4	353,0±65	142,1±9
Аноксия	0,97±0,04	9,6±0,9	1,2±0,30	8,0	435,5±39	112,0±8
Нога						
Нормоксия	0,80±0,09	4,7±0,1	1,1±0,10	4,2	88,6±6	42,0±3
Аноксия	1,25±0,13	7,2±0,4	0,9±0,11	8,0	108,1±5	30,8±5

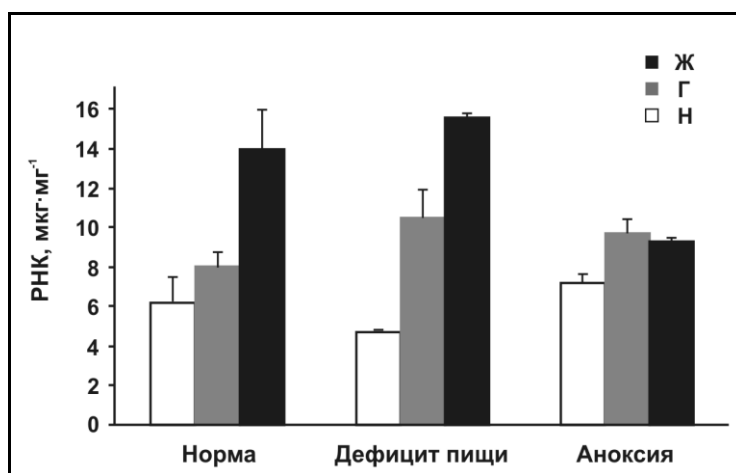


Рис. 7.9. Содержание РНК в тканях анадары в условиях нормы, дефицита пищи и аноксии (Н – нога; Г – гепатопанкреас; Ж – жабры)

В сравнении с жабрами и гепатопанкреасом в ноге моллюска отмечали противоположные изменения. Содержание СН и РНК увеличивалось в среднем в 1,5 раза, а значения индекса РНК/ДНК - почти в 2 раза, что свидетельствовало об активизации процессов белкового синтеза. Это происходило на фоне повышения АК и снижения содержания белка в 1,2 раза.

Дефицит пищи оказывал избирательное действие на ткани моллюска. В жабрах и гепатопанкреасе происходил рост содержания РНК, а в ноге достоверное снижение.

Таким образом, в условиях аноксии во всех тканях происходило снижение содержания белка и повышалось содержание аминокислот. При этом в одном случае это происходило на фоне снижения скоростей соматического роста (жабры, гепатопанкреас), в другом – на фоне их увеличения (нога). Причины, лежащие в основе этих различий, пока труднообъяснимы.

7.4. Тканевая специфика белкового синтеза в условиях действия токсических соединений

Полихлорбифениловые соединения (ПХБ) – химически устойчивые хлорорганические соединения, представляющие собой продукт исключительно антропогенного происхождения. Эти вещества находятся в воде, главным образом, на поверхности взвешенных в воде частиц, но с течением времени выпадают в осадок. Концентрации ПХБ в грунтах могут достигать 3-6,8 мг кг⁻¹ [Поликарпов, Жерко, 1996; Жерко и др., 2002]. В настоящее время ПХБ встречаются в тканях морских организмов разных трофических уровней. Концентрация ПХБ в полихетах, двустворчатых моллюсках, иглокожих, ракообразных может колебаться в пределах 3280-16400 нг·г⁻¹ [Поликарпов, Жерко, 1996]. В литературе имеются данные по накоплению этого вещества целым организмом этих животных [Жерко и др., 2002; Бочко и др., 2004]. Тканевая специфика реакции на это вещество и степень его накопления у двустворчатых моллюсков практически не изучена, за исключением ряда работ [Nasci et al., 1998; Robertson, Lawenstein, 1998; Бочко и др., 2004].

Другим токсически опасным и распространенным реагентом водной среды является тетрадецилтриметиламмоний бромид (ТДТМА), относящийся к группе ионогенных детергентов [Паршикова, Негрузкий, 1988; Остроумов, Колесников, 2003]. Повреждающее действие на живые объекты обусловлено, главным образом, его выраженным перфорирующим действием на биологические мембраны клеток [Паршикова, Негрузкий, 1988; Rosen et al., 2001; Ying, 2006]. В результате происходит развитие окислительного стресса, с частичным повреждением молекул белков, нуклеиновых кислот и других клеточных структур. Выявлено негативное влияние подобных ТДТМА поверхностно-активных веществ на скорость роста и выживаемость морских водорослей [Паршикова, Негрузкий, 1988], скорость питания брюхоногих моллюсков [Остроумов, Колесников, 2003], фильтрационную активность ряда других моллюсков [Остроумов, 2003], а также на систему антиоксидантной защиты мидий [Гостюхина и др., 2007]. Однако воздействие катионных детергентов в целом, и ТДТМА в частности, на процессы обмена и особенности протекания физиологических процессов у морских двустворчатых моллюсков изучено еще очень слабо. Одним из таких неизученных аспектов остаются процессы биосинтеза и тканевого роста.

Настоящее исследование направлено на изучение тканевой спецификации белкового синтеза у мидий в условиях токсического действия ТДТМА и ПХБ.

7.4.1. Влияние ПХБ на процессы соматического роста тканей *M. galloprovincialis*

Исследовались взрослые особи черноморской мидии *M. galloprovincialis* (длина раковины 45-55 мм.), находящиеся в состоянии относительного физиологического покоя (стадии зрелости гонад – 2-3). Место сбора – коллекторные носители в бухте Стрелецкая (Севастополь) при фоновой концентрации ПХБ 20,6 нг л⁻¹. Экспериментальную группу моллюсков содержали в воде, при уровне токсиканта 110 нг л⁻¹. В качестве токсиканта использовался ароклор 1254. Температура воды – 21-23⁰С. Пищевой режим, обеспечивающий

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

нормальную жизнедеятельность моллюсков, поддерживался введением в среду монокультуры зеленой одноклеточной водоросли *Isochrizis golbana*.

Максимальный уровень РНК и наиболее высокие значения индекса РНК/ДНК были определены для жабр (контрольная группа). Несколько более низкие значения получены для ноги животных (табл. 7.8). В гепатопанкреасе и гонадах процессы биосинтеза белка протекали на более низком уровне (контрольная группа). В сравнении с жабрами, концентрация РНК в этих тканях была в 2-4 раза ниже ($p < 0,01$). Значительные отличия отмечены и в отношении индекса РНК/ДНК.

Таблица 7. 8

Влияние ПХБ на содержание РНК и ДНК в тканях *M. galloprovincialis*

Ткани моллюска	РНК, мкг мг ⁻¹ сухого веса		ДНК, мкг мг ⁻¹ сухого веса		РНК/ДНК	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Нога	1,13±0,15	1,61±0,17	0,13±0,01	0,17±0,02	8,8±1,5	9,9±1,9
Жабры	1,24±0,14	0,89±0,05	0,11±0,01	0,19±0,03	11,7±1,8	5,0±0,9
Гепатопанкреас	0,61±0,03	0,63±0,03	0,12±0,01	0,11±0,01	5,0±0,2	5,6±0,2
Гонады	0,32±0,04	0,67±0,04	0,21±0,01	0,19±0,03	1,5±0,2	4,1±0,9

Наибольший токсический эффект ПХБ выявлен для жабр моллюска. В ткани явно угнетались процессы регенерации. Добавление в среду ароклора-1254 приводило к снижению содержания в жабрах СН (с 0,32 мкг мг⁻¹ до 0,10 мкг мг⁻¹) и РНК (с 1,24 мкг мг⁻¹ до 0,89 мкг мг⁻¹ сухого веса). Индекс РНК/ДНК уменьшался в 2,3 раза ($p < 0,01$), что свидетельствовало о замедлении процессов белкового синтеза в этом органе.

Известно, что жабры двустворчатых моллюсков обладают одной из наиболее высоких скоростей роста и регенерации в сравнении с другими типами тканей, что связано с их прямым взаимодействием со средой [Cui et al., 1996]. Это нашло подтверждение в ростовых параметрах.

Реакция тканевых структур гепатопанкреаса и ноги была практически одинакова. Полученные данные по ростовым показателям не дали статистически достоверных различий в контрольных и экспериментальных образцах, что позволяет говорить о стабильности процесса. В гонадах, напротив, отмечали активизацию ростовых процессов. Уровень РНК повышался в 2,1 раза ($p < 0,01$), а индекс РНК/ДНК – в 2,7 раза ($p < 0,05$).

Известно, что аккумулятивная способность генеративной ткани, как при фоновой, так и при экспериментальной концентрации ПХБ достаточно низкая в сравнении с другими тканями [Бочко и др., 2004]. Одним из известных путей удаления токсинов из организма является выброс их с половыми продуктами [Foster, Berlin, 1997]. Возможно, данный механизм выведения ПХБ из организма моллюсками носит целенаправленный характер. Усилению процессов биосинтеза в гонадах, на наш взгляд, могли способствовать и экспериментальные условия содержания: благоприятная температура воды (21°C), полноценный пищевой рацион, – которые могли стимулировать репродуктивные процессы в генеративной ткани.

Влияние ПХБ на количественное содержание ДНК в тканях не обнаружено. Содержание данного соединения в тканях животных опытной и контрольной группы оставалось стабильным и изменялось в относительно узком диапазоне значений. Статистически достоверные различия получены только для жабр, у которых в контроле содержание ДНК составляло $0,11 \pm 0,01$ мкг мг⁻¹, а в опыте – $0,19 \pm 0,03$ мкг мг⁻¹.

7.4.2. Влияние катионнодетергента (ТДТМА) на процессы соматического роста тканей *M. galloprovincialis*

В работе использовали взрослых особей с длиной раковины 40-45 мм, черной цветовой морфы. Экспериментальную группу подвергали воздействию ТДТМА в концентрации $0,6$ мг л⁻¹ в течение 6 суток. Выбранная концентрация наиболее приемлема для оценки протекающих в тканях процессов, так как, с одной стороны, не являлась пороговой (гибель свыше 50 % особей в популяции мидий наступает при более высокой концентрации, свыше 1 мг л⁻¹), с другой – оставалась достаточно высокой и наиболее часто встречаемой концентрацией в пробах морской воды.

Введение в среду ТДТМА вызывало снижение содержания РНК в жабрах и ноге моллюска в 1,4-1,5 раза. При этом пул свободных нуклеотидов не претерпевал существенных изменений. Одновременно отмечали понижение значений индекса РНК/ДНК с 14,8 до 10,0, что отражало угнетение процессов биосинтеза белка в данных органах. При этом в гепатопанкреасе не отмечали каких-либо существенных изменений (рис. 7.10-12).

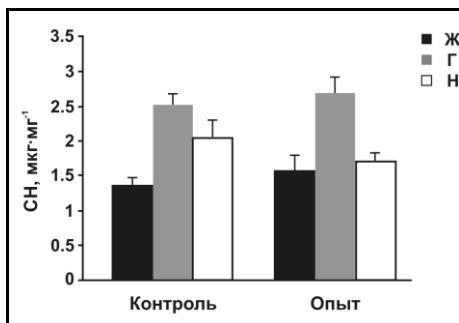


Рис. 7.10. Влияние ТДТМА на содержание свободных нуклеотидов (СН) в тканях мидий

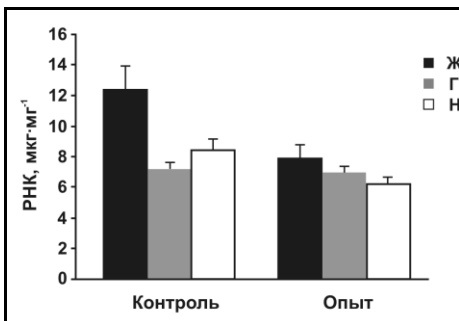


Рис. 7.11. Влияние ТДТМА на содержание РНК в тканях мидий

Процессы роста и регенерации тканей у массовых видов двустворчатых...

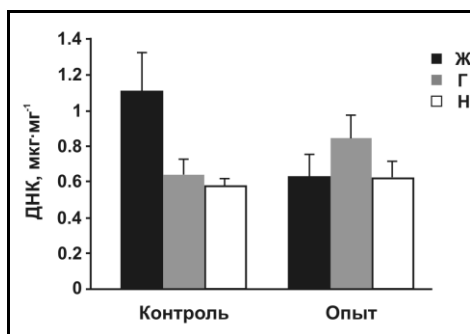


Рис. 7.12. Влияние ТДТМА на содержание ДНК в тканях мидий

Как и в случае действия ПХБ, высокая чувствительность жабр объяснялась, скорее всего, прямым контактом со средой и такими структурно-функциональными особенностями, как незначительная толщина жаберного эпителия и способность к быстрой его регенерации. Имеющиеся данные [Гостюхина и др., 2007] свидетельствуют о наличии высокого уровня окислительных процессов и росте активности ферментов антиоксидантной защиты в жабрах и ноге мидий при этих же концентрациях ТДТМА (см. раздел 2.4).

Таким образом, накопление ПХБ в жабрах мидии приводило к снижению содержания в них свободных нуклеотидов, концентрации РНК и уменьшало значения индекса РНК/ДНК, что отражало угнетение процессов регенерации в данном органе. Одновременно активизировались ростовые процессы в гонадах моллюска, о чем свидетельствовал значительный рост содержания РНК и отношения РНК/ДНК. Состояние остальных органов (гепатопанкреас, нога) не претерпевало существенных изменений.

Катионный детергент ТДТМА оказывал основной эффект на периферические органы моллюска (жабры и ногу). Это выражалось в снижении содержания РНК и величины индекса РНК/ДНК, что свидетельствовало о замедлении процессов белкового анаболизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей монографии обобщены результаты экспериментальных исследований, посвященных изучению особенностей тканевого метаболизма и состояния ряда молекулярных систем у наиболее массовых видов черноморских моллюсков, которые были выполнены в отделе физиологии животных и биохимии ИнБЮМ НАН Украины на протяжении последних 15 лет.

Здесь впервые приводится **сводка о видовом разнообразии малакофауны** черноморского региона, которая представлена только тремя из восьми известных классов. Наиболее многочисленными являются представители класса брюхоногих моллюсков (Gastropoda) (более 130 видов), относящиеся к 5 подклассам, 24 отрядам и 56 семействам. Достаточно высокое видовое разнообразие отмечено и для представителей класса двустворчатых моллюсков (Bivalvia) (около 90 видов): 4 подкласса, 14 отрядов, 34 семейства. Класс панцирных моллюсков (Polyplacophora / Logicata), напротив, малочислен и представлен только тремя видами. С позиций концепции адаптивных циклов К.С. Холлинга [Holling, 2001] всесторонне рассмотрены причины изменения структуры таксоцены черноморских моллюсков.

Значительный объем монографии посвящен изучению **антиоксидантного ферментативного комплекса тканей** двустворчатых моллюсков. Основные эксперименты выполнены на *Mytilus galloprovincialis* Lam. Выявлено, что организация АО комплекса у данного вида имеет выраженную тканевую специфику. В жабрах ведущая роль принадлежит ферментам, сопряженным с ресурсом восстановленного GSH. Гепатопанкреас характеризуется высокими активностями каталазы и пероксидазы. Функционирование АО комплекса ноги отличалось повышенной активностью СОД. Отмечено, что снижение содержания каротиноидов в тканях подавляет активности ключевых АО ферментов антирадикальной защиты: СОД и каталазы и сопровождается падением ресурса GSH.

Изучено состояние АО комплекса тканей у *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного (нерест) и искусственного (действие катионного детергента) окислительного стресса. Отмечено, что реакции моллюска на оба вида нагрузок количественно и качественно сопоставимы. Это необходимо учитывать при диагностике токсичности водной среды. При этом показано, что АО система жабр моллюсков черной морфы является малочувствительной к естественным состояниям, но реагирует на воздействие внешнего токсического фактора. Это позволяет рекомендовать показатели ее АО комплекса в качестве биомаркеров окислительного стресса антропогенного происхождения.

Обобщены материалы по реакции ферментативного АО комплекса тканей моллюсков рода *Mytilus* на окислительную нагрузку разной интенсивности. Показано, что по мере увеличения уровня окислительного стресса наблюдается рост активности ГР, ГП и повышается скорость оборота GSH в тканях. Затем токсическая нагрузка компенсируется повышением активности ферментов низкого сродства к гидроперекисям – каталазы. В глутатионовой системе можно выделить несколько устойчивых во времени состояний: низкого, умеренного и высокого напряжения. В отдельных тканях (нога) функционирование АО системы, вероятно, направлено не на обезвреживание, а на генерацию активных форм кислорода (O_2^-), что связано с повышенной интенсивностью регенерационных процессов.

Заключение

Сравнительные исследования АО комплекса у *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara inaequalvis* и *Crassostrea gigas* показали, что наибольшую окислительную нагрузку в естественных условиях испытывали ткани мидий. У них отмечены самые высокие активности АО ферментов и максимальный уровень ПОЛ в тканях. Основная роль в нейтрализации этой нагрузки принадлежала гепатопанкреасу. У анадары в этом процессе значительное участие принимают также жабры и нога. Активность ключевых АО ферментов – СОД и каталазы, в жабрах анадары была вдвое выше, чем у мидий и устриц. Уровень же окислительных процессов в тканях анадары, в целом, был ниже, чем у мидии, но выше, чем у устрицы. Для тканей устриц характерен низкий уровень процессов ПОЛ. Активности большинства АО ферментов (за исключением ГР) минимальны, а межтканевые различия слабо выражены.

На основе комплекса современных методов исследования: ТСХ, КХ, HPLC, качественных реакций на присутствие химических групп, спектрального анализа в UV-VIS диапазоне, FAB MS и ¹H-NMR впервые проведена подробная идентификация **качественного состава каротиноидов** тканей массовых видов черноморских моллюсков: мидий, устриц, анадар и рапан, с учетом особенностей их экологии.

В теле мидий идентифицировано 20 каротиноидов (более 99 % состава), у устриц – 6 каротиноидов (более 80 % состава), у анадар – 6 каротиноидов (более 95 % состава) и у рапан – 9 каротиноидов (более 85 % состава). Отмечено, что основным органом, содержащим каротиноиды у малоподвижных и прикрепленных форм двустворчатых моллюсков-фильтраторов, является гепатопанкреас, а у подвижных – нога.

Для каждого вида моллюска определена основная группа каротиноидных пигментов. Отмечено, что аллоксантин, диатоксантин и пектенол *A* являются общими для тканей двустворок. Выявлены видоспецифичные группы пигментов: у устриц – крассостреаксантин *A* и *B*, у мидий – митилоксантин и гетероксантин, у анадар – транс- и 9-цис-пектенолон. Предложены схемы трансформации каротиноидов в трофической цепи «фитопланктон → моллюски-фильтраторы».

Впервые в тканях мидий в минорном количестве идентифицированы 3 новых 19'-гексаноилоксикаротиноидов: 19'-гексаноилоксигалоцинтиаксантин, 19'-гексаноилоксикрассостреаксантин *A*, 19'-гексаноилоксиалленикмитилоксантин. Предлагается новая схема трансформации соединений этого ряда.

Уточнены процессы преобразования каротиноидов в трофической системе: «моллюск-фильтратор → моллюск-хищник», на примере основных каротиноидов тканей мидии и рапаны. Одна схема основана на накоплении в тканях хищника аллоксантина, как основного диацетиленового каротиноида с учетом всех его изомерных и эфирных форм, другая – на трансформации диатоксантина до 7,8-дидегидроастаксантина.

Исследованы особенности адаптивной реорганизации тканевого метаболизма в условиях **экспериментальной аноксии и голодания** у моллюска-вселенца *Anadara inaequalvis*. Впервые показано, что кислородные потребности этого вида в условиях внешней нормоксии снижены в 6-7 раз в сравнении с мидиями. В большинстве тканей преобладают анаэробные процессы, что определяет их низкий энергетический статус: пониженный уровень АТФ и невысокие значения АЭЗ и ФП.

Заключение

В условиях аноксии отмечается мобилизация белковых ресурсов организма анадары. Содержание белка в тканях понижается на 23-27 % на фоне роста уровня аминного азота и мочевины на 35-100 %. Гидролизу подвергаются преимущественно низкомолекулярные пептиды, что отражает рост активности γ -ГТП при параллельном уменьшении активности катепсина D. Показано, что адаптация к состоянию аноксии сопровождается ростом значений индекса МДГ/ЛДГ – в 2-4 раза. Это происходит на фоне усиления сукцинаттиокиназной и фумаратредуктазной реакций, контролируемых АлАТ и АсАТ, которые исключают накопление токсичного лактата в тканях и позволяют получать дополнительный ресурс макроэргов. Метаболические процессы в гепатопанкреасе моллюска ориентированы преимущественно на продукцию аминокислот.

Впервые проведены исследования по изучению состояния аденилатной системы тканей моллюсков, толерантных к дефициту кислорода. Выявлено, что аноксия вызывает снижение энергетического потенциала тканей моллюска на 40-45 %. Это находит отражение в уменьшении пула адениловых нуклеотидов, снижении содержания фракций АТФ, АДФ, а также значений АЭЗ и ФП. Изменения носят сбалансированный характер и являются функционально достаточными для поддержания суббазальных скоростей метаболизма, что находит отражение в сохранении жизнеспособности особей в течение 3-х суточной аноксии.

Впервые изучены процессы энергообеспечения тканей у двусторчатых моллюсков в условиях голодания. Установлено, что на начальных этапах (6 суток) анадара использует значительный ресурс тканевого лактата. Процесс адаптации анадары к голоданию идет по пути использования резерва аминокислот в процессах энергетического обеспечения тканей. Донором аминокислот выступает гепатопанкреас.

При помощи методов световой микроскопии (масляная иммерсия, 1500 \times) исследованы особенности **функциональной морфологии и цитометрии эритроидных элементов гемолимфы *Anadara inaequalis***. Показано, что ее эритроциты являются узко специализированными клетками с высоким внутриклеточным содержанием гемоглобина (180.64 ± 32.51 пг), повышенной удельной поверхностью (1.558 ± 0.002 мкм⁻¹) и функционально малоактивным ядром, о чем свидетельствует крайне низкие значения ядерно-плазматических отношений (0.083 ± 0.001). Ядро клетки имеет незначительный объем (29.93 ± 0.73 мкм³) с высокой долей гетерохроматина. Цитоплазма эритроцитов содержит гранулярные включения в количестве 41.95 ± 2.75 единиц на клетку. Они не являются постоянными структурами. Их присутствие связано с функциональной активностью клетки. При ядерно-плазматическом отношении близком к 0.04 включения практически не выявляются. Гемолимфа моллюска не содержит эритроидных элементов на ранних стадиях дифференцировки, что отражает нерегулярность эритропоэтических процессов в кроветворной ткани.

Исследовано в экспериментальных условиях влияние аноксии на морфо-функциональные и цитометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы анадары. Показано, аноксия вызывает гидратацию цитоплазмы и набухание (свеллинг) эритроидных элементов. Об этом свидетельствует характер изменения эритроцитарных индексов (*MCV*, *MCH*, *MCHC*) и линейных характеристик клеток. Это сопровождалось лизисом преимущественно старых клеточных форм, имеющих более низкую осмотическую стойкость. Разрушение

Заключение

старой эритроцитарной массы приводило к относительному росту содержания в гемолимфе клеток более ранних генераций. Последнее определяло увеличение средноклеточного объема ядра, содержания базофильных зернистых включений в цитоплазме и повышение устойчивости эритроидных элементов моллюска к осмотическому шоку.

Впервые предложен **метод фотографирования и цифровой обработки снимков раковин моллюсков** в системе координат Red-Hue (Adobe Photoshop CS-3). Он позволил однозначно идентифицировать 4 цветовые группы *Mytilus galloprovincialis*: черные, переходные, темно-коричневые, светло-коричневые. Между ними отмечены существенные отличия в активности АСТ и АЛТ, задействованных в процессах анаэробного метаболизма. Наибольшие расхождения выявлены между крайними группами: с черной и светло-коричневой окраской раковины. Допускается, что они могут быть связаны с адаптацией моллюсков к условиям скальных и донных экотопов.

Оценка «мгновенной» скорости соматического роста тканей моллюсков проводилась на основании значений **индекса РНК/ДНК**. Полученные результаты свидетельствуют о высокой интенсивности процессов регенерации в жабрах и мантии моллюсков – тканях наиболее подверженных механической и химической нагрузке при вентиляции мантийной полости (мидии, анадара). Особенно это хорошо выражено у молодых (мелкоразмерных) особей. Самые низкие значения индекса были отмечены для гепатопанкреаса. Процессы синтеза белка в гонадах зависят от степени готовности их к нересту. Максимальные значения индекса РНК/ДНК отмечены у особей, находящихся на 4-5 стадии зрелости. У самцов эти процессы протекают в 2 раза эффективнее, чем у самок.

В условиях аноксии (3 суток) у анадары во всех тканях происходит снижение содержания белка и повышалось содержание свободных аминокислот. При этом в одном случае это происходило на фоне уменьшения скоростей соматического роста (жабры, гепатопанкреас), в другом – на фоне их увеличения (нога). Причины, лежащие в основе этих различий, пока трудно объяснить.

В условиях эксперимента изучено влияние ряда токсических соединений, относящихся к группе ПХБ (ароклор 1254) и катионных детергентов (ТДТМА) на скорости соматического роста тканей мидий. Накопление ПХБ в жабрах мидии приводило к снижению содержания в них свободных нуклеотидов, концентрации РНК и уменьшало значения индекса РНК/ДНК, что отражало угнетение процессов регенерации в данном органе. Одновременно активизировались ростовые процессы в гонадах моллюска, о чем свидетельствовал значительный рост содержания РНК и отношения РНК/ДНК. Состояние остальных органов (гепатопанкреас, нога) не претерпело существенных изменений. Катионный детергент ТДТМА оказывал основной эффект на периферические органы моллюска (жабры и ногу). Это выражалось в снижении содержания РНК и величины индекса РНК/ДНК, что свидетельствовало о замедлении в них процессов белкового синтеза.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Аболмасова Г.И. Скорость обмена у некоторых беспозвоночных Средиземного моря // Биология моря. – 1978. – № 46. – С. 25–29.
- Айздайчер Н.А., Маркина Ж.В. Токсическое действие детергентов на водоросль *Plagioselmis prolonga* (Cryptophyta) // Биология моря. – 2006. – 32, № 1. – С. 50–54.
- Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. Плазматическая мембрана // Молекулярная биология клетки: В 5-ти т. – М., 1986. – 2. – С. 65–132.
- Александрова О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Особенности глутатионпероксидной системы в тканях двух цветковых морф черноморской мидии // Экология моря. – 2001. – № 58. – С. 22–26.
- Александрова О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Особенности глутатионпероксидной системы черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. с различной пигментацией тканевых структур // Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки: Материалы Первой Междунар. науч.-практ. конф. М.-Голицыно, 26-30 авг. 2002. – М.: ВНИРО, 2002. – С. 95–100.
- Алтухов Д. А. Видовое разнообразие фитопланктона Чёрного моря: методические рекомендации по созданию базы данных // Экология моря. – 2000. – № 52. – С. 79–82.
- Андреева С.И., Андреев Н.И. Эволюционные преобразования двустворчатых моллюсков Аральского моря в условиях экологического кризиса. – Омск: Изд-во Омского государственного педагогического университета, 2003. – 382 с.
- Андреевко Т.И. Особенности белкового метаболизма двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Вг. в условиях экспериментальной аноксии // Экология моря. – 2009. – № 78. – С. 11–18.
- Андреевко Т.И., Солдатов А.А., Головина И.В. Адаптивная реорганизация метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Bruguiere в условиях экспериментальной аноксии // Доп. НАН України. – 2009а. – № 7. – С. 155–160.
- Андреевко Т.И., Солдатов А.А., Головина И.В. Особенности реорганизации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* (Bruguiere, 1789) в условиях экспериментального голодания // Морск. экол. ж. – 2009б. – 8, № 3. – С. 15–24.
- Анистратенко В.В., Анистратенко О.Ю., Халиман И.А. Состав фауны моллюсков Азовского моря как функция его соленостного режима // Доп. НАН України. – 2007. – №4. – С. 161–166.
- Анистратенко В.В., Халиман И.А. Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalvis* (Bivalvia, Arcidae) в северной части Азовского моря: завершение колонизации Азово-Черноморского бассейна // Вестник зоологии. – 2006. – 40, № 6. – С. 505–511.
- Анистратенко О., Анистратенко В. Зоогеография и экология среднесарматских гастропод Восточного Паратетиса // Ruthenica. – 2012. – 22, № 2. – С. 115–134.

Цитированная литература

- Анистратенко О.Ю., Литвиненко Д.П., Анистратенко В.В. Новые данные о фауне брюхоногих моллюсков Молочного лимана и прилегающей части Азовского моря // Экология моря. – 2000. – № 50. – С. 45–48.
- Байкова В.Н., Дурнов Л.А., Чернова Н.В., Заева Г.Е., Зайцева Л.А., Думбрайс К.О., Захарова Н.В., Грачева И.В., Леонидова Ю.А., Лебедев В.И., Моисеенко В.И. Метаболизм тирозина, состояние антиоксидантной системы и процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов при пигментном невусе и меланоме у детей // Эксперим. онкология. – 2000. – 22. – С. 142–147.
- Бачурин С.О. Медико-химические подходы к направленному поиску препаратов для лечения и предупреждения болезни Альцгеймера: [Электронный документ] // Вопр. мед. химии. – 2001. – № 2. (<http://medi.ru/pbmc/8810201.htm>)
- Безвушко А.И. Видовой состав и сезонная динамика меропланктона района Карадагского природного заповедника (Черное море) // Экология моря. – 2001. – № 56. – С. 23–26.
- Биргер Т.И. Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. – Киев: Наука, 1979. – 189 с.
- Болтачев А.Р. Траловый промысел и его влияние на донные биоценозы Черного моря // Морск. экол. ж. – 2006. – 5, № 3. – С. 45–56.
- Бондарь Т.Н., Ланкин В.З., Антоновский В.Л. Восстановление органических гидропероксидов глутатионпероксидазой и глутатион-S-трансферазой: влияние структуры субстрата // ДАН СССР. – 1989. – 304, № 1. – С. 217–220.
- Боровинский А.Г. Влияние концентрации кислорода в морской воде на интенсивность дыхания черноморских мидий // Моллюски, результаты и перспективы их исследований. – 1987. – № 8. – С. 272–273.
- Бородина А.В. Особенности состава каротиноидов устриц *Crassostrea gigas* Thunberg в зависимости от плоидности и условий обитания // Экология моря. – 2009. – № 79. – С. 31–36.
- Бородина А.В. Каротиноиды тканей черноморских моллюсков с различным типом питания: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 2013. – 24 с.
- Бородина А.В., Маока Т., Солдатов А.А. Состав и содержание каротиноидов в теле черноморского брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2013. – 49, № 3. – С. 187–194.
- Бородина А.В., Нехорошев М.В., Маока Т., Солдатов А.А. Состав каротиноидов гонад брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes) // Доп. НАН України. – 2010. – № 11. – С. 136–142.
- Бородина А.В., Нехорошев М.В., Солдатов А.А. Каротиноидный состав тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Br. – вселенца в Чёрное море // Экология моря. – 2008. – № 72. – С. 34–39.
- Бородина А.В., Нехорошев М.В., Солдатов А.А. Особенности состава каротиноидов тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Bruguiere // Доп. НАН України. – 2009. – 5. – С. 186–190.
- Бородина А.В., Солдатов А.А. Сравнительная оценка содержания и состава каротиноидов в тканях различных цветовых морф *Mytilus galloprovincialis*

Цитированная литература

- Lam. // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-та. Серія: біологія. – 2010. – **44**, № 3. – С. 25–28.
- Бочко О.Ю., Солдатов А.А., Шульман Г.Е. Тканевая специфика распределения ПХБ у *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) в экспериментальных условиях. // Тез. Межд. конф., 6-9 сент. 2004. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». – Петрозаводск, 2004. – С. 19–20.
- Брайко В.Д. Метаболиты мидий и их роль в модификации микроусловий ценоза обрастаний // Биология моря. – 1979. – № 48. – С. 9–15.
- Брайко В.Д., Дерешкевич С.С. Сезонные изменения в дыхании мидий // Биология моря. – 1978. – № 44. – С. 31–36.
- Брень Н.В. Использование беспозвоночных для мониторинга загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами (Обзор) // Гидробиол. ж. – 1999. – **35**, № 4. – С. 75–87.
- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
- Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Каталаза и супероксиддисмутаза: распространение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов // Биохимия. – 2004. – **69**, № 9. – С. 1170–1186.
- Булатов К.В. Генетическая природа окраски раковин у черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Докл. АН УССР. – Сер. Б. – 1984. – № 6. – С. 53–55.
- Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. – 1985. – **LIV**, №9. – С. 1540–1558.
- Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости /Избр. Произведения в 2 т. – Л.: Наука, 1967. – **1**. – С. 7–61.
- Вараксин А.А. Нейроэндокринные циклы и регуляция гаметогенеза у двустворчатых моллюсков // Экспериментальная экология морских беспозвоночных. – Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. – С. 43–45.
- Ведутенко В.В., Писаренко Л.М., Касаикина О.Т. ПАВ – супрамолекулярные катализаторы реакции β-каротина с гидропероксидами // XI Междунар. конф. по химии органических и элементоорганических пероксидов: Тез. докл. (Москва, 24–26 июня 2003 г.) – М., 2003. – С. 129–130.
- Вехова Е.Е. Функциональная морфология и физиология трех видов митилид (*Bivalvia*) из Японского моря в связи с особенностями их пространственного распределения: автореф. дисс... канд. биол. наук. – Владивосток: Ин-т биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, 2007. – 23 с.
- Винберг Г.Г. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. – Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1956. – 254 с.
- Винберг Г.Г. Продукция популяций водных беспозвоночных животных и общие основы методов ее определения // Общие основы изучения водных экосистем. – Л.: Наука, 1979. – С. 114–119.
- Виноградова Л.А., Маштакова Г.П., Дерезюк Н.В. Сукцессионные изменения в фитопланктоне северо-западной части Черного моря // Исследования экосистемы пелагиали Черного моря. – М.: Наука, 1986. – С. 170–179.
- Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии // Биохимия. – 2004. – **69**, № 1. – С. 5–7.

Цитированная литература

- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
- Вялова О.Ю. Особенности энергетического и азотистого метаболизма неполовозрелых мидий *Mytilus galloprovincialis* в условиях эксперимента: автореф. дисс... канд. биол. наук. – Севастополь, 2000. – 16 с.
- Вялова О.Ю., Бородина А.А., Щербань С.А. Первые результаты вселения и выращивания тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* различной плоидности в Черном море // Материалы 3-й междунар. научно- практ. конф. «Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки (Владивосток, 8–10 сент. 2008 г.). – Владивосток, 2008. – С. 231.
- Гаевская А.В. Паразиты, болезни и вредители мидий (*Mytilus*, *Mytilidae*). II. Моллюски (*Mollusca*). – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2006. – 100 с.
- Гаевская А.В., Губанов В.В., Мачкевский В.К. Паразиты, комменсалы и болезни черноморской мидии. – Киев: Наук. думка, 1990. – 132 с.
- Гирич С.В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лаб. диагностика. – 1999. – № 4. – С. 45–46.
- Говорин И.А., Курагин А.П. Оценка влияния хищного брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes, 1841) на фильтрационный потенциал мидийных поселений // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. – 2011. – 25 (1). – С. 435–442.
- Головина И.В. Влияние неблагоприятных факторов среды на активность ферментов в тканях черноморских моллюсков // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-та. Сер.: Біологія. – 2005. – № 4(27). – С. 46–47.
- Головина И.В., Гостюхина О.Л., Андреев Т.И. Характеристики антиоксидантной системы, углеводного и белкового обмена в тканях толерантного к гипоксии гемоглобин-содержащего моллюска *Anadara inaequalis* // III Съезд физиологов СНГ (Ялта, 2–6 октября 2011 г.) – М., 2011. – С. 289.
- Голявин А.А., Карташева З.С., Касакина О.Т. Особенности распада гидропероксида кумила, катализированного алкилсульфатами натрия // XI Междунар. конф. по химии органических и элементоорганических пероксидов: Тез. докл. (Москва, 24–26 июня 2003 г.) – М., 2003. – С. 76–77.
- Гордеева А.В., Лабас Ю.А. Генерация активных форм кислорода наружными поверхностями водных организмов // Цитология. – 2003. – 45, № 3. – С. 284–289.
- Горомосова С.А., Таможня В.А. Уровень трансаминазной активности в тканях мидий в норме и условиях гипоксии // Биология моря. – 1979. – № 48. – С. 118–122.
- Горомосова С.А., Таможня В.А. Сезонная динамика ферментов переаминирования в тканях черноморской мидии // Биология моря. – 1980. – № 2. – С. 62–68.
- Горомосова С.А., Шапиро А.З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. – М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. – 118 с.
- Гостюхина О.Л. Состояние ферментативной системы антиоксидантной защиты у черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса: коричневая морфа // Наукові записки Терноп. нац. пед. ун-т. Серія: біологія. Спец. випуск:

Цитированная литература

- гидроэкология. – 2005. – № 4(27). – С. 52–54.
- Гостюхина О.Л. Сравнительная характеристика глутатионового антиоксидантного комплекса черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara inaequalis* Br. // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2012. – **48**, № 5. – С. 439–444.
- Гостюхина О.Л., Головина И.В. Состояние системы антиоксидантной защиты в тканях черноморской камбалы-калкан в период нереста // Укр. биохим. ж. – 2010. – **82**, № 5. – С. 35–41.
- Гостюхина О.Л., Головина И.В. Тканевые особенности антиоксидантной системы двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* // Гидробиол. ж. – 2012. – **48**, № 1. – С. 86–94.
- Гостюхина О.Л., Головина И.В. Сравнительное исследование антиоксидантного комплекса тканей черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara inaequalis* и *Crassostrea gigas* // Гидробиол. ж. – 2013. – **49**, № 1. – С. 82–91.
- Гостюхина О.Л., Головина И.В., Гиригосов В.Е., Ханайченко А.Н. Половые особенности антиоксидантной системы тканей черноморской камбалы-калкан // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер.: Біологія. – 2010. – Спец. вип. «Гідроекологія». – № 3(44). – С. 56–59.
- Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Активность ферментов пероксидного комплекса тканей мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в норме и условиях естественного окислительного стресса // Морск. экол. ж. – 2005. – № 1: отд. №– С. 23–31.
- Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Влияние тетрадецилтриметиламмоний бромида на состояние ферментативной системы антиоксидантной защиты тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Доп. НАН України. – 2007. – № 11. – С. 147–151.
- Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В., Бородин А.В. Содержание каротиноидов и состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2012. – **48**, № 6. – С. 542–547.
- Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В., Столбов А.Я. Антиоксидантный ферментативный комплекс тканей различных цветовых морф черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. – 2005. – **68**. – С. 42–47.
- Гостюхіна О.Л. Особливості антиоксидантного статусу тканин двостулкового моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в умовах окислювального стресу: автореф. дис...канд. біол. наук : 03.00.13-Фізіологія людини і тварин. – Сімферополь, 2008. – 20 с.
- Гришичева Н.П., Шадрин Н.В. Гидроиды как эпibiонты мидии и цистозирры // Акватория и берега Севастополя: экосистемные процессы и услуги обществу. – Севастополь: Аквита, 1999. – С. 229–237.
- Данилова М.М. Соотношение растительных и животных объектов в пищеварительном тракте мидий Черного моря // Вісник Житомирського державного університету імені Івана Франка. – 2002. – № 10. – С. 144–146.
- Дас Д.К., Молик Н. Превращения сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигнализации // Биохимия. – 2004. – **69**, № 1. – С. 16–24.

Цитированная литература

- Джазаэрли М.С., Давыдов В.В.* Особенности формирования оксидативного стресса в печени крыс с гипотиреозом при интенсивной физической нагрузке в зависимости от возраста животных // Укр. биохим. ж. – 2006. – **78**, № 5. – С. 132–138.
- Дивавин И.А.* Нуклеиновый обмен черноморских гидробионтов в различных бухтах юго-западного побережья Крыма // Экология моря. – 1980. – № 2. – С. 48–51.
- Димитров П., Димитров Д.* Черное море: потоп и древние мифы. – Варна: Славена, 2008. – 90 с.
- Довженко Н.В.* Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на воздействие повреждающих факторов среды: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2006 – 22 с.
- Долматова Л.С., Елисейкина М.Г., Ромашина В.В.* Антиоксидантная ферментативная активность целомацитов дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2004. – **40**, № 2. – С. 105–111.
- Дубинина Е.Е.* Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма // Успехи соврем. биол. – 1989. – **108**, №1(4). – С. 3–18.
- Дубинина Е.Е., Шугалей И.В.* Окислительная модификация белков // Успехи соврем. биол. – 1993. – **113**, №1. – С. 71–81.
- Дьяконова В.Е.* Поведенческие функции опиоидных пептидов у беспозвоночных // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2001. – **37**, № 4. – С. 253–261.
- Еремеев В.Н., Болтачев А.Р., Гаевская А.В., Гришин А.Н., Загородняя Ю.А., Зуев Г.В., Мильчакова Н.А., Миронов О.Г., Сергеева Н.Г., Финенко З.З., Шульман Г.Е.* Современное состояние промысловых биоресурсов Черного моря // Морск. экол. ж. – 2009. – **4**, VIII – С. 5–23.
- Жерко Н.В., Малахова Л.В., Бочко О.Ю.* Сравнительная оценка степени загрязнения мидий и донных осадков акватории Карадагских и Северных бухт хлорорганическими соединениями. // Экология моря. – 2002. – № 61. – С. 81–84.
- Заика В.Е., Валовая Н.А., Повчун А.С., Ревков Н.М.* Митилиды Черного моря. – К.: Наук. думка, 1990. – 207 с.
- Заика В.Е., Загородняя Ю.А., Колесникова Е.А., Мачкевский В.К., Мильчакова Н.А., Неврова Е.Л., Сенчикова Л.Г., Сергеева Н.Г., Серобаба И.И., Шадрин Н.В.* Морское биоразнообразие / Биоразнообразие Крыма: оценка и потребности сохранения // Рабочие материалы, представленные на международный семинар (Гурзуф, ноябрь-1997). – 1997. – Симферополь. – С. 62–66.
- Зайцев Ю.П.* Введение в экологию Черного моря. – Одесса: Эвен, 2006. – 224 с.
- Зайцев Ю.П., Фесюнов О.Е., Синегуб И.А.* Влияние донного тралового промысла на экосистему черноморского шельфа // Доп. НАН України. — 1992. — № 3. — С. 153–155.
- Захаров В. М., Баранов А. С., Борисов В. И., Валецкий А. В., Кряжева Н. Г., Чистякова Е. К., Чубинишвили А. Т.* Здоровье среды: методика оценки. – М: Центр экологической политики России, 2000. – 68 с.

Цитированная литература

- Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи соврем. биол. – 1993. – **113**, № 3. – С. 286–296.
- Золотарев В.Н., Золотарев П.Н. Двустворчатый моллюск – новый элемент фауны Черного моря // ДАН СССР. – 1987. – **297**. – С. 501–502.
- Золотарев П.Н., Литвиненко Н.М., Терентьев А.С. Пространственно-временные масштабы заморных явлений и сукцессионные изменения в структуре донных сообществ под их влиянием // Труды ЮгНИРО. – 1996. – **42**. – С. 239–242.
- Золотницкая Р.П. Методы гематологических исследований / Лабораторные методы исследования в клинике (справочник). – М.: Медицина, 1987. – С. 106–148.
- Золотницкий А.П. Энергетический баланс и соотношение продукции и метаболизма у тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*), интродуцированной в Черное море // Экология моря. – 2002. – № 61. – С. 74–77.
- Золотницкий А.П. Современное состояние, проблемы и перспективы развития конхиокультуры в Украине // Рыбное хозяйство Украины. – 2011. – № 4. – С. 45–48.
- Золотницкий А.П., Моница О.Б. Рост и продукция тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas* Thunberg), акклиматизируемой в Черное море // Экология моря. – 1992. – № 41. – С. 77–80.
- Зоров Д.Б., Б Анникова С.Ю., Белоусов В.В., Высоких М.Ю., Зорова Л.Д., Исаев Н.К., Красников Б.Ф., Плотников Е.Ю. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота (Обзор) // Биохимия. – 2005. – **70**, № 2. – С. 265–272.
- Иванов В.Н., Холодов В.И., Сеничева М.И. Биология культивируемых мидий. – Киев: Наук. думка, 1989. – 99 с.
- Иванов Д.А., Синегуб И.А. Трансформация биоценозов Керченского пролива после вселения хищного моллюска *Rapana thomasiana* и двустворчатых *Mya arenaria* и *Sinearca cornea* // Современные проблемы Азово-Черноморского региона : материалы 3-й Междунар. конф. : тез. докл. (Керчь, 10-11 ноября, 2007 г.). – Керчь, 2008. – С. 45–51.
- Иванович Г.В. Динамика вмісту глікогену та сумарних ліпідів у мідій *Mytilus galloprovincialis* Lam. Одеської затоки: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2005. – 23 с.
- Ивлев В.С. Элементы физиологической гидробиологии // Физиология морских животных. – М.: Наука, 1966. – С. 3–45.
- Ивлев В.С. Экспериментальная экология питания рыб. – Киев: Наукова думка, 1977. – 270 с.
- Ивлева И.В. Температура среды и скорость энергетического обмена у водных животных. – Киев: Наук. Думка, 1981. – С. 232.
- Ивлиева О.В. Влияние биогенного фактора на современное осадконакопление Азовского моря // Геология, география и экология океана // Матер. Межд. Конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Д.Г. Панова (Ростов-на-Дону, 8-10 июня 2009). – Ростов-на-Дону, 2009. – С. 135–137.
- Истомина А.А. Реакция антиоксидантной системы у массовых видов моллюсков залива Петра Великого в условиях дефицита кислорода и действия ионов Cu^{2+} : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2012 – 22 с.
- Казанкова И.И. Сезонная динамика личинок двустворок и их вертикальное

Цитированная литература

- распределение в прибрежном планктоне внешнего рейда Севастопольской бухты (Черное море) // Экология моря. – 2002. – № 61. – С. 59–63.
- Казанкова И.И. Частота цветовых морф в поселениях *Mytilus galloprovincialis* в прибрежных водах южного и юго-западного Крыма. // Экология моря. – 2008. – № 75. – С. 38–41.
- Казанкова И.И. Влияние освещённости на формирование фенетической структуры поселений *Mytilus galloprovincialis* у берегов Крыма // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Биол. – 2010. – 44, №3. – С. 107–110.
- Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 501 с.
- Караванцева Н.В., Щербань С.А. Сравнительный анализ содержания нуклеиновых кислот в генеративной ткани и половых продуктах черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Материалы междунауч. конф. «Современное состояние водных биоресурсов и экосистем морских и пресных вод проблемы и пути решения», посв. 100-летию со дня рождения Г.В. Никольского (Ростов-на-Дону, 20-23 сент. 2010 г.). – Ростов-на-Дону, 2010. – С. 164–168.
- Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. – М.: Наука, 1988. – 240 с.
- Касаикина О.Т., Карташева З.С. Амфифильные свойства гидропероксидов и их проявление в процессах окисления // XI Междунар. конф. по химии органических и элементоорганических пероксидов: Тез. докл. (Москва, 24–26 июня 2003 г.). – М., 2003. – С. 188.
- Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи соврем. биол. – 1993. – 113, №4. – С. 456–470.
- Керкис Ю.Я. Физиологические изменения в клетке как причина мутационного процесса // Усп. совр. биол. – 1940. – 12. – С. 143–155.
- Кернична І.З. Окислювальні процеси в організмі щурів за ураження солями Zn та Cu в підвищених дозах // Наук. Вісн. Ужгород. Унів-ту. Сер. Біологія. – 2006. – № 19. – С. 29–31.
- Коваль Т.В., Марченко С.В., Матишевська О.П. Активність ферментів системи глутатіону в ізольованих тимоцитах щурів за дії пероксиду водню // Доп. НАН України. – 2006. – № 9. – С. 176–180.
- Козлов М.В., Урнышева В.В., Шишкина Л.Н. Влияние повреждающих факторов на содержание пероксидов и продуктов окисления в печени мышей // XI Международная конф. по химии органических и элементоорганических пероксидов: Тез. докл. (Москва, 24–26 июня 2003 г.). – М., 2003. – С. 189.
- Козлов Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов в биомембранах в норме и при патологии // Биоантиокислители. – М.: Наука, 1975. – С. 5–13.
- Козминский Е.В., Лезин П.А. Методика цветовых измерений элементов окраски раковины у брюхоногих моллюсков // Биология моря. – 2006. – 32, № 5, С. 371–373.
- Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионпероксидазы // Успехи соврем. биол. – 1989. – 107, № 2. – С. 179–194.
- Колотилова Н.Н., Пискункова Н.Ф., Остроумов С.А. Воздействие катионогенных СПАВ на пресноводные цианобактерии и зеленые микроводоросли //

Цитированная литература

- Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии. – М., 1998. – С. 337–338.
- Колючкина Г.А., Исмаилов А.Д. Параметры экстрацеллюлярной жидкости двустворчатых моллюсков - неспецифические биомаркеры кратковременного загрязнения водной среды // Океанология. – 2007. – **47**, № 2. – С. 233–240.
- Кондратович В.Г., Карташева З.С., Касаикина О.Т. Влияние поверхностно-активных веществ на разложение гидропероксидов природных жирных кислот // XI Международная конф. по химии органических и элементоорганических пероксидов: (Москва, 24–26 июня 2003 г.). – Москва, 2003. – С. 80–81.
- Константинов А.С. Общая гидробиология. – М.: Изд-во ВШ, 1986. – С. 206–210.
- Корогодина В.И., Корогодина В.Л., Файси Ч. Функциональная концепция мутагенеза // Природа. – 1990. – №2. – С. 5–12.
- Корочкин Л.Н. Введение в генетику развития. – М.: Наука, 1999. – 254 с.
- Косовер Н., Косовер Э. Глутатион-дисульфидная система // Свободные радикалы в биологии: в 2-х т. – М.: Мир, 1979. – **2** – С. 65–95.
- Куликова А.Д. Выявления цветовых морф моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. с использованием компьютерной обработки фотографий // Морск. экол. ж. – 2012. – **11**, № 3. – С. 63–67.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Обмен глутатиона // Успехи соврем. биол. – 1990а. – **31**, № 6. – С. 157–179.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Успехи соврем. биол. – 1990б. – **110**, №1(4). – С. 20–33.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи соврем. биол. – 1993. – **113**, №1. – С. 107–122.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомедицинская химия. – 2009. – **55**, №3. – С. 255–277.
- Куфтаркова Е.А., Сеничева М.И. Биогенные элементы как основа биопродуктивности вод района мидийной фермы // Экология моря. – 2009. – №77. – С. 62–66.
- Кучеренко Н.Е., Виноградова Р.П., Литвиненко А.Р., Цудзевич Б.А., Васильев А.Н. Биохимический справочник. – Киев: Вища школа, 1979. – 304 с.
- Ладыгина Л.В. Биохимическая характеристика микроводорослей – кормовых объектов двустворчатых моллюсков // Рыбн. хоз-во Украины. – 2005. – № 7. – С. 97–100.
- Лобашов М.Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вест. Ленингр. ун-та. – 1947. – №8. – С. 10–29.
- Лось Д.А. Восприятие сигналов биологическими мембранами: сенсорные белки и экспрессия генов // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 9. – С. 14–22.
- Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. – М.: Наука, 1982. – 301 С.

Цитированная литература

- Лукьянова О.Н. Молекулярные биомаркеры энергетического метаболизма мидий при антропогенном загрязнении зал. Петра Великого Японского моря. – Экология. – 2006. – № 3. – С. 227–231.
- Лукьянова О.Н., Шмидт Т.Я. Концентрация каротиноидов у морских беспозвоночных в условиях загрязнений // Биология моря. – 1993. – № 2. – С. 92–101.
- Львова Л.В. Поиск продолжается // Провизор. – 1999. – № 11. (<http://www.provisor.com.ua/archive/1999/N11/lvova.htm>).
- Маздунян С.А., Болтачева Н.А., Ревков Н.К. Изменение разнообразия бентоса в биотопе песка в акватории Карадагского природного заповедника (юго-восточное побережье Крыма) /Карадаг–2009. Сб. научных трудов. – Севастополь: ЭКОСИ-гидрофизика, 2009. – С.382–400.
- Максименко А.В. Модифицированные препараты супероксиддисмутазы и каталазы для защиты сердечно-сосудистой системы и легких // Успехи соврем. биол. – 1993. – **113**, №3. – С. 351–359.
- Марикультура мидий на Чёрном море / под ред. В.Н. Иванова – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. – 312 с.
- Маслова М.Н., Солдатов А.А., Тавровская Т.В. Сезонная динамика состояния системы красной крови некоторых черноморских рыб // Ж. эвол. биох. физиол. 1988. – **24**. – С. 516–520.
- Маслова М.Н., Тавровская Т.В. Динамика сезонных изменений в системе красной крови низших позвоночных: сезонная динамика эритропозеза у форели *Salmo gairdneri* // Ж. эвол. биох. физиол. – 1991. – **27**. – С. 796–798.
- Мачкевский В.К., Шадрин Н.В. Популяционные аспекты взаимодействия мидии *M. galloprovincialis* и метацеркарий *Parvatrema duboisi* // Морфология и экология паразитов морских животных. – 1990. – С. 48 – 52.
- Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 278 с.
- Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи соврем. биол. – 1993. – **113**, № 4. – С. 442–455.
- Мецлер Д. О том, как электроны встречаются с кислородом, как при этом образуется АТФ и о некоторых родственных явлениях // Мецлер Д. Биохимия: в 3 т. – М., 1980. – **2**, гл. 10. – С. 361–455.
- Микроводоросли Чёрного моря: проблемы биоразнообразия, сохранения и биотехнологического использования / под ред. Ю.Н. Токарева, З.З. Финенко, Н.В. Шадрина; НАН Украины, Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского. – Севастополь: ЭКОСИ–Гидрофизика, 2008. – 454 с.
- Мильман Л.С., Юровецкий Ю.Г., Ермолаева Л.П. Определение активности важнейших ферментов углеводного обмена // Методы биологии развития. – М.: Наука, 1974. – С. 346–364.
- Мишин В.М., Ляхович В.В. Дисмутаза O₂⁻: физико-химические свойства, каталитический механизм и биологическое значение // Успехи соврем. биол. – 1976. – **82**, №3(6). – С. 338–355.
- Мордухай-Болтовской Ф.Д. Каспийская фауна в Азово-Черноморском бассейне. – Москва: Ленинград: Изд-во АН СССР, 1960. – 286 с.

Цитированная литература

- Мотавкин П.А., Вараксин А.А.* Гистофизиология нервной системы и регуляция размножения у двустворчатых моллюсков. – М.: Наука, 1983. – С. 102–175.
- Невесская Л.А., Попов С.В., Гончарова И.А., Ильина Л.Б., Парамонова Н.П.* Ускоренная эволюция моллюсков. Восточного Паратетиса в условиях пониженной конкуренции // Эволюция биосферы и биоразнообразия: к 70-летию А.Ю. Розанова. – Москва: КМК, 2006. – С. 334–358.
- Немова Н.Н.* Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб – Петрозаводск: 1996. – 104 с.
- Нестерова Д.А.* Итоги и перспективы исследований фитопланктона северо-западной части Черного моря // Экология моря. – 2003. – № 63. – С. 53–57.
- Новицкая В.Н.* Морфо-функциональные и цитометрические характеристики циркулирующих эритроцитов скорпены (*Scorpaena Porcus L.*) // Современные проблемы гидробиологии. Перспективы, пути и методы решений: Материалы III Международной научной конференции (Херсон, 17–19 мая 2012 г.). – Херсон, 2012а. – С. 249–252.
- Новицкая В.Н.* Морфо-функциональные и цитометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы *Anadara inaequalvis* // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-та. Серія: біологія. – 2012б. – № 2 (51). – С. 201–207.
- Новицкая В.Н., Солдатов А.А.* Особенности функциональной морфологии эритроидных элементов гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis*, Черное море // Гидробиол. ж. – 2013. – **49**, № 4. – С. 69–77.
- Овечкина З.А., Кучина Н.Б., Мартынюк В.С.* Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в печени крыс с различным типом поведения в «открытом поле» // Актуальные вопросы развития инновационной деятельности в государствах с переходной экономикой. – Симферополь, 2001. – С. 82–84.
- Оксененко С.В.* Вміст ліпідів у тканинах щурів за дії хлоридів важких металів та в умовах профілактичного введення пентоксифіліну. Автореф. дис... канд. біол. наук. — К., 2005. — 20 с.
- Определитель фауны Черного и Азовского морей / под общим руководством Ф. Д. Мордухай-Болтовского. – К.: Наук. думка, 1972. – **3**: Свободноживущие беспозвоночные. Членистоногие (кроме ракообразных), моллюски, иглокожие, щетинкочелюстные, хордовые – 340 с.
- Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А.* Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. химии. – 1990. – **31**, № 6. – С. 180–208.
- Основы биохимии: в 3-х т. / под ред. А.Уайт, Ф.Хендлер, Э.Смит и др.; Пер. с англ. – М.: Мир, 1981. – **1**. – 535 с.
- Остроумов С.А.* Действие некоторых амфифильных веществ и смесевых препаратов на морских моллюсков // Гидробиол. ж. – 2003. – **39**, № 2. – С. 103–108.
- Остроумов С.А., Вальц Н., Руше Р.* Воздействие катионного амфифильного вещества на коловраток // Докл. РАН. – 2003. – **390**, № 3. – С. 423–426.
- Остроумов С.А., Виддоус Дж.* Воздействие катионного поверхностно-активного вещества на мидий: ингибирование фильтрации воды // Вестник МГУ. Сер. 16. Биология. – 2004. – № 4. – С. 38–41.

Цитированная литература

- Остроумов С.А., Колесников М.П.* Моллюски в биогеохимических потоках (С, N, P, Si, Al) и самоочищении воды: воздействие ПАВ // Вестник МГУ. Сер. 16. Биология. – 2003. – № 1. – С. 15–24.
- Парфенова И.А., Солдатов А.А.* Эритрограмма циркулирующей крови скорпены в условиях экспериментальной гипоксии // Морск. экол. ж. – 2005. – 4, № 2. – С. 59–67.
- Парфенова И.А., Солдатов А.А.* Функциональная морфология циркулирующих эритроцитов бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии // Морск. экол. ж. – 2011. – 10, № 2. – С. 59–67.
- Паршикова Т.В., Негрузкий С.Ф.* Влияние поверхностно-активных веществ на водоросли (Обзор) // Гидробиол. ж.– 1988. – 24, N. 6. – С. 46 – 58.
- Патологическая физиология : учеб. для мед. вузов / под ред. А. Д. Адо, В.В. Новицкого. – Томск : Изд-во Томского ун-та, 1994. – 468 с.
- Перслегина И. А.* Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 20–23.
- Петкевич Н.С., Вялова О.Ю.* О вариабельности морфологических и биохимических характеристик у черноморских мидий // Наук. зап. Терноп. Пед. ун-та. Сер. Биол. – 2005. – 4(27). – С. 174–176.
- Пиневиц А.В., Аверина С.Г.* Кислородная фототрофия : руководство по эволюционной клеточной биологии. – СПб. : СПбГУ, 2002. – 234 с.
- Пиркова А.Д., Ладыгина Л.В., Столбова Н.Г.* Наследования признака радиальной полосатости раковины у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Гидробиол. ж. – 2002. – № 3.
- Пиркова А.В., Ладыгина Л.В., Столбова Н.Г., Иванов В.Н.* Популяционно-генетические исследования мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. – 2000. – № 50. – С. 70–75.
- Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф.* Биологическая роль супероксиддисмутазы // Укр. биохим. ж. – 1989. – 61, № 2. – С. 14–28.
- Поликарпов Г.Г., Егоров В.Н.* Морская динамическая радиохемозология. – М.: Энергоиздат, 1986. – 176 с.
- Поликарпов Г.Г., Жерко Н.В.* Экологические аспекты изучения загрязнения Черного моря хлорорганическими ксенобиотиками. // Экология моря. – 1996. – № 45. – С. 99–101.
- Поляков Н.Э., Лешина Т.В.* Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование // Успехи химии. – 2006. – 75, № 12. – С. 1175–1192.
- Поспелова Н.В.* Элементы баланса каротиноидов, α -токоферола и некоторых металлов в системе «взвешенное вещество – мидии – биоотложения» : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.17 – Севастополь, 2008. – 155 с.
- Поспелова Н.В., Нехорошев М.В.* Содержание каротиноидов в системе: «взвешенное вещество – мидия (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) – биоотложения мидий» // Экология моря. – 2003. –
- Практикум по иммунологии: учеб. пособие для студентов вузов / под ред. А. Фриммеля. – М.: Медицина, 1989. – 224 с.
- Пригожин И., Стенгерс И.* Порядок из хаоса. Новый диалог человека с природой. Москва: Прогресс, 1986. 432 с.

Цитированная литература

- Пузанов И.И. Последние стадии медитерранизации фауны Черного моря (Новые данные) // Гидробиол. ж. – 1965. – **1**, № 2. – С. 54–63.
- Пузанов И.И. Медитерранизация фауны Черного моря и перспективы ее усиления // Зоол. ж. – 1967. – **46**, № 9. – С. 1287–1296.
- Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // Методы биохим. исслед. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – С. 183–186.
- Раузер-Черноусова Д.М. Геологическое обследование Соленого озера в Круглой бухте близ Севастополя // Изв. АН СССР, отд. физ.-мат. Наук. – 1928. – № 3. – С. 273–298.
- Ревков Н.В., Болтачева Н.А., Николаенко Т.В., Колесникова Е.А. Разнообразие зообентоса рыхлых грунтов в прибрежной зоне Крымского побережья Черного моря // Океанология. – 2002. – **42**, № 4. – С. 561–571.
- Рудаков О.Б., Перикова Л.И., Болотов В.М., Сташина Г.А. Хроматографическое определение натуральных и искусственных каротиноидов в пищевых продуктах // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 1. – С. 78–84.
- Рудик В.Ф. Условия каротинообразования у *Dunaliella salina* Teod. CALU-834 // Альгология. – 1993. – **3**, № 3. – С. 86–89.
- Руднева И.И. Применение биомаркеров рыб для экотоксикологической диагностики водной среды // Рыбное хозяйство Украины. – 2006. – № 1. – С. 20–23.
- Руднева И.И., Чесалина Т.Л., Кузьминова Н.С. Ответные реакции молоди черноморской кефали на загрязнение мазутом // Экология. – 2000. – № 4. – С. 304–306.
- Руднева-Титова И.И. Соотношение процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности в тканях черноморской мидии // Гидробиол. ж. – 1996. – **32**, № 5. – С. 50–57.
- Руднева-Титова И.И. Эколого-филогенетические особенности активности некоторых антиоксидантных ферментов и содержания антиоксидантов в тканях хрящевых и костистых рыб Черного моря // Ж. эволюц. биох. физиол. – 1997. – **33**, № 1. – С. 29–37.
- Савина М.В. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. – С.-Петербург: Наука, 1992. – 200 с.
- Сеничева М.И. Характеристика фитопланктона как объекта питания мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. в районе марихозяйства бухты Ласпи // Экология моря. – 1990. – №36. – С. 7–15.
- Сеничева М.И., Куфтаркова Е.А., Ковригина Н.П. Условия формирования кормовой базы мидий в районе экспериментального марихозяйства в районе Севастополя // Эколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження молюсків і роль у біоіндикації стану навколишнього середовища. – Житомир, 2006. – №2. – С. 317–320.
- Скулачев В.П. Старение как атавистическая программа, которую можно попытаться отменить // Вестник РАН. – 2005. – **75**, № 9. – С. 831–843.
- Скурлатов Ю.И., Эрнестова Л.С., Штамм Е.В., Шпотова Т.В., Калинин В.Б. Редокс-состояние и сезонная токсичность природной воды // ДАН СССР. – 1984. – **276**, № 4. – С. 1014–1016.

Цитированная литература

- Соколовский В.В. Окислительно-восстановительные процессы в биохимическом механизме неспецифической реакции организма на действие экстремальных факторов внешней среды // Антиоксиданты и адаптация. – М., 1984. – С. 5–19.
- Соколовский В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальные воздействия (обзор) // Вопр. мед. химии. – 1988. – № 6. – С. 2–11.
- Солдатов А.А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2005а. – **41**, № 3. – С. 217–223.
- Солдатов А.А. Эритропоэз и концентрация метгемоглобина в крови кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) на протяжении годового цикла // Совр. пробл. физиол. биохим. водн. организмов. – Петрозаводск: Изд-во ин-та биологии, КарНЦ РАН, 2005б. – С. 182–187.
- Солдатов А.А. Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis* Br. в условиях экспериментальной аноксии // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2009. – **45**, № 3. – С. 284–289.
- 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 // Доп. НАН України. – 2003. – № 5. – С. 162–166.
- Солдатов А.А., Андреевко Т.И., Головина И.В. Особенности организации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequivalvis* Bruguiere // Доп. НАН України. – 2008. – № 4. – С. 161–165.
- Солдатов А.А., Андреевко Т.И., Головина И.В., Столбов А.Я. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2010. – **46**, № 4. – С. 284–290.
- Солдатов А.А., Андреевко Т.И., Сысоева И.В., Сысоев А.А. Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis* Br. в условиях экспериментальной аноксии // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2009. – **45**, № 3. – С. 284–289.
- Солдатов А.А., Бочко О.Ю., Головина И.В., Щербань С.А. Биохимические эффекты полихлорированных бифенилов на организм черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Морск. экол. ж. – 2005. – № 1. – С. 105–112.
- Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Бородина А.В., Головина И.В. Качественный состав каротиноидов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в тканях двустворчатого моллюска *anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2013. – **49**, № 4. – С.
- Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Ж. эволюц. биох. физиол. – 2008 – **44**, №2. – С. 150–155.
- Солдатов А.А., Новицкая В.Н., Парфенова И.А. Функциональная морфология ядерных эритроцитов гидробионтов (рыбы, моллюски) в условиях внешней гипоксии и аноксии // Современные проблемы эволюционной морфологии животных: Материалы II Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных»

Цитированная литература

- к 105-летию со дня рождения академика А.В. Иванова (Санкт-Петербург, 17–19 октября 2011 г.) – СПб: ЗИН РАН, 2011. – С. 322–326.
- Солдатов А.А., Столбов А.Я., Головина И.В., Андреевко Т.И., Холодов В.И. Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequalis* Br. // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-та. Серія: біологія. 2005. – 4, № 27. – С. 230–232.
- Солдатов А.А., Сысоева И.В., Сысоев А.А., Андреевко Т.И. Аденилатная система тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* в условиях экспериментальной аноксии // Гидробиол. ж. – 2010. – 46, №3. – С. 69–78.
- Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Дилакян Э.А. Коллагеназы I и IV типов и их эндогенные регуляторы в иммортализованных и трансформированных фибробластах [Электронный ресурс] // Вопр. мед. химии. – 2001. – № 1. <http://medi.ru/pbmc/8810105.htm>.
- Сон М.О. Моллюски-вселенцы в пресных и солоноватых водах Северного Причерноморья. — Одесса: Друк, 2007. – 132 с.
- Сон М.О. Моллюски – вселенцы на территории Украины: источники и направления инвазий // Рос. ж. биол. инвазий. – 2009. – № 2. – С. 37–47.
- Спиридонова И.А. Обмен тирозина и метионина при различных состояниях меланогенеза: автореф. дисс. ...канд. биол. наук. – М.: Ун-т Дружбы Народов им. П. Лумумбы. – 1990. – 17 с.
- Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – 23, № 5. – С. 656–662.
- Стадниченко С.В., Золотарев В.Н. Популяционная структура морских двустворчатых моллюсков в районе дельты Дуная в 2007-2008 гг. // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. – 2009. – №20. – С. 248–261.
- Старобогатов Я.И. Фауна моллюсков и зоогеографическое районирование континентальных водоемов Земного шара. – Ленинград: Наука, 1970. – 372 с.
- Стельмах Л.В., Куфтаркова Е.А., Бабич И.И. Сезонная изменчивость скорости роста фитопланктона в прибрежных водах Черного моря (район Севастополя) // Морск. экол. ж. – 2009. – VIII, № 1. – С. 67–80.
- Стельмах Л.В., Сеничева М.И., Бабич И.И. Эколого-физиологические основы «цветения» воды, вызываемого *Emiliana huxleyi* в Севастопольской бухте // Экология моря. – 2009. – №77. – С. 28–32.
- Столбова Н.Г., Ладыгина Л.В. Генетический полиморфизм мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. у берегов Крыма // Цитология и генетика. – 1994. – 28, № 2. – С. 62–66.
- Столбова Н.Г., Пиркова А.Д. Гибридологический анализ наследования цвет края мантии и ноги у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Цитология и генетика. – 1995. – 29, № 1. – С. 71–77.
- Столбова Н.Г., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Наследование цвета раковины у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Цитология и генетика. – 1996. – 30, № 6. – С. 62–65.

Цитированная литература

- Столяр О.Б., Грубінко В.В., Зінковська Н.Г. Інтегральний показник антиоксидантно-прооксидантного стану організму як інструмент біомолекулярного моніторингу // Медична хімія. – 2004. – 6, № 3. – С. 66–68.
- Страйер Л. Биохимия: в 3 т. – М.: Мир, 1984. – 1. – 232 с.
- Супрунович А.В. Аквакультура беспозвоночных. – К. : Наук. думка, 1988. – 154 с.
- Таможняя В.А. Метаболизм сообщества обрастаний. Сообщение II. Редокс-состояние среды обитания в зависимости от стадии развития сообщества // Экология моря. – 1989. – №31. – С. 66–73.
- Тарасов Г.А., Алексеев В.В., Хасанкаев В.Б., Юкиа В.В. Некоторые вопросы биогенного воздействия на донные осадки в прибрежной зоне Баренцева моря / Подводные методы в морских биологических исследованиях. – Апатиты: КФ АН СССР. – 1979. – С. 50–59.
- Ташкэ К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. – Бухарест: Изд-во Академии Респ. Румынии, 1980. – 291 с.
- Терентьев А.С. Динамика запасов мидии (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) в Керченском предпроливье Чёрного моря // Труды ВНИРО. – 2007. – 147. – С. 335–347.
- Трапезов О.В. Гомологические ряды изменчивости окраски меха у американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) в условиях domestikации // Вестник ВОГиС. – 2007. – 11, № 3/4. – С. 547–560.
- Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. – М.: Мир, 1981. – 3. – С. 1157–1878.
- Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. – М.: Мир, 1978. – 720 с.
- Фальфушинская Г.И., Базан О.Г., Столяр О.Б. Система антиоксидантной защиты в тканях пресноводного двустворчатого моллюска *Colletopterum pictinale* (Unionidae) в условиях естественного водоема и переселения // Гидробиол. ж. – 2008. – 44, № 3. – С. 56–68.
- Федоров А.В. Авторадиографическое исследование пролиферативной активности амебоцитов *Dressena polymorpha* в условиях экспериментального восполнения // XI Международная Научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов–2004. – М.: МГУ, 2004. – С. 68–69.
- Фильченков А.А., Завелевич М.П., Поспелова Н.В., Нехорошев М.В. Индукция апоптоза клеток МТ-4 лейкоза человека при действии фукоксантина из бурых черноморских водорослей // Российский биотерапевтический ж. – 2008. – 7, № 3. – С. 97–98.
- Финенко Г.А., Романова З.А., Аболмасова Г.И. Экологическая энергетика черноморских мидий // Биоэнергетика гидробионтов – К.: Наук. думка, 1990. – С. 32–72.
- Фокина Н.Н., Нефедова З.А., Немова Н.Н. Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (Обзор) // Труды Карельского научного центра РАН. – 2011. – № 3. – С. 121–130.
- Фридович И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода // Свободные радикалы в биологии: в 2 т. – М.: Мир, 1979. – 1. – С. 272–314.
- Хакен Г. Синергетика. – Москва: Мир, 1980. – 406 с.
- Хлебович В.В. Очерки экологии особи. – Санкт-Петербург, 2012. – 142 с.
- Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Выращивание мидий и устриц в Черном

Цитированная литература

- море / под. ред. В.Н. Еремеева; НАН Украины, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. – Севастополь. – 2010. – 424 с.
- Христофорова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. – Л.: Наука, 1989. – 192 с.
- Цихон-Луканина Е.А. Питание черноморских двустворчатых моллюсков // Биология моря. – 1976. – № 3 – С. 42–48.
- Цихон-Луканина Е.А. Трофология водных моллюсков. – М.: Наука, 1987. – 176 с.
- Цуканов А.В., Миловидова П.Ю. Статистический анализ распространения брюхоногого моллюска *Tritia reticulata* (Linne) // Экология моря. – 1980. – №1. – С. 44–47.
- Челомин В.П., Бельчева Н.Н., Захарцев М.В. Биохимические механизмы адаптации мидии *Mytilus trossulus* к ионам кадмия и меди // Биология моря. – 1998. – 24, № 5. – С. 319–325.
- Ченцов Ю.С. Общая цитология: учебник для студентов биол. спец. ун-тов. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 344 с.
- Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – 474 с.
- Чикина М.В., Колючкина Г.А., Кучерук Н.В. Аспекты биологии размножения *Scapharca inaequivalvis* (Bruguiere) (Bivalvia, Arcidae) в Черном море // Экология моря. – 2003. – № 64. – С. 72–75.
- Чихачев А.С., Фроленко Л.Н., Реков Ю.И. Новый вселенец в Азовское море // Рыбное хозяйство. – 1994. – № 3. – С. 40.
- Чухчин В.Д. Экология брюхоногих моллюсков Черного моря. – Киев: Наук. думка, 1984. – 176 с.
- Шадрин Н.В. О необходимости нового эволюционного синтеза и участия в нём гидробиологов // Морск. экол. ж. – 2009. – 8, №2. – С. 80–90.
- Шадрин Н.В. Динамика экосистем и эволюция: множественность устойчивых состояний и точки опрокидывания/невозврата. Необходимость нового понимания // Морск. экол. ж. – 2012. – 11, №2. – С. 85–95.
- Шадрин Н.В. Альтернативные устойчивые состояния озерных экосистем и критические солёности: есть ли жесткая связь? // Тр. Зоол. ин-та РАН. – 2013 (в печати).
- Шадрин Н.В., Афанасова Т.А. Питание и распределение *Rapana venosa* (Valenciennes, 1864) в акватории Опукского заповедника (Восточный Крым, Чёрное море) // Морск. экол. ж. – 2009. – 8, №2. – С. 24.
- Шадрин Н.В., Лежнев И.В. Изменение популяции *M. galloprovincialis* под влиянием сточных вод // Биоэнергетика гидробионтов – Киев: Наук. Думка, 1990. – С. 78–82.
- Шадрин Н.В., Миронов С.С., Веремеева Е.В. Флуктуирующая асимметрия двустворчатых моллюсков песчаной сублиторали у берегов Крыма (Чёрное море) // Экология моря. – 2005. – 68. – С. 93–98.
- Шадрин Н.В., Миронов С.С., Холопцев А.В., Обрывков В.А. Изменения популяций донных моллюсков бухты Круглая (Черное море) как отклик на многолетние ритмы изменчивости режима осадков // Изучение зообентоса шельфа. Информационное обеспечение экосистемных исследований. – Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2004. – С.126–139.

Цитированная литература

- Шадрин Н.В., Сосновская Л.В. Разрушение береговой полосы и состояние морских сообществ: взаимосвязь причин и следствий // Наук. Записки Тернопіл. держ. пед. ун-т. Сер. біологія. - 2001. - № 3(14). - С. 170–171.
- Шапиро А.З., Бобкова А.Н. Активность гликолитических ферментов в тканях беспозвоночных // Биохим. эволюция. - Л.: Наука, 1973. - С. 42–47.
- Шапиро А.З., Бобкова А.Н. Роль малатдегидрогеназы беспозвоночных в адаптации в адаптации к дефициту кислорода // Ж. эволюц. биох. физиол. - 1975. - **11**, № 5. - С. 547–547.
- Шапиро А.З., Звездовская Н.М. Об изменении содержания белка в тканях мидий при экспериментальных воздействиях (в условиях эксперимента) // Экология моря. - 1986. - №24. - С. 96–102.
- Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных: Приспособление и среда / Пер. с англ. Гроздовой М.Д., Рожковой Г.И.; Под ред. и с предисл. Е.М. Крепса. - М.: Мир, 1982. - 416 с.
- Шульман Г.Е. Изменение состава печени кальмара *Sthenoteuthis onalaniensis* (Lesson) при выдерживании в протоке // Экология моря. - 1982. - №10. - С. 87–90.
- Шульман Г.Е., Аболмасова Г.И., Столбов А.Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи совр. биол. - 1993. - **113**, № 5. - С. 576–586.
- Шульман Г.Е., Вялова О.Ю. О соотношении анаболической и катаболической фаз конечного белкового метаболизма у молоди черноморской мидии // Доклады Академии Наук. - 2000. - **372**, № 5. - С. 695–697.
- Шурова Н. М. Золоторев В. Н. Количественная оценка зараженности фенетических групп черноморской мидии трематодой *Parvatrema duboisi* // Сборник отчетов: третья всесоюзная конференция - 1988 - С. 72–73.
- Шурова Н.М., Золоторев В.Н. Анализ фенотипической структуры поселений мидий *Mytilus galloprovincialis* Черного моря по окраске наружного призматического слоя их раковин // Морск. экол. ж. - 2008. - **7**, №4. - С. 88–97.
- Щербань С.А. Соотношение между индексом РНК-ДНК, содержанием белка и сухой массой у мидий в условиях кратковременного эксперимента // Гидробиол. ж., - 1992. - **28**, №. 3. - С. 60–65.
- Щербань С.А. Эколого-физиологические особенности и биохимические индикаторы роста черноморской мидии *Mytilu galloprovincialis*.: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - С.- Петербург, 1995. - 27с.
- Щербань С.А. Фенотипические различия показателей “мгновенной” скорости роста черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Тавр. мед.- биол. вестник. - 1999. - № 3 - С. 41–47.
- Щербань С.А. Особенности соматического и генеративного роста у некоторых цветовых морф мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. - 2000. - №53. - С. 77–81.
- Щербань С.А. Влияние тетрадецилтриметиламмоний бромида (ТДТМА) на белковый биосинтез тканей двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam // Материалы межд. конф. «Экология водных беспозвоночных», посв.100-летию со дня рождения Ф.Д. Мордухай-Болтовского (Борок, 30 окт.- 2 нояб. 2010 г.). - Борок, 2010. - С. 361 – 364.

Цитированная литература

- Щербань С.А. Тканевые особенности белкового анаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis* Br. в условиях нормы, при дефиците пищи и аноксии // Гидробиол. ж. – 2011. – **4**, № 6. – С. 22–30.
- Щербань С.А., Аболмасова Г.И. Рост мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в бухте Ласпи Черного моря // Биология моря. – 1991. – № 2. – С. 82–89.
- Щербань С.А., Андреевко Т.И. Тканевые особенности белкового анаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis* Br. в условиях экспериментальной аноксии // Материалы 2-ой науч. конф. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 11–14 сент., 2007 г.). – Петрозаводск, 2007. – С. 177–178.
- Щербань С.А., Вялова О.Ю. Влияние краткосрочной гипоксии на некоторые ростовые показатели черноморской мидии в условиях дефицита пищи // Экология моря. – 2001. – №58. – С. 57–60.
- Щербань С.А., Вялова О.Ю. Половые и фенотипические особенности содержания РНК в гонадах черноморских мидий // Доп. НАН України. – 2008. – № 2. – С. 166–170.
- Ahmad M., Skibinski D.O.F., Beardmore J.E. An estimate of the amount of genetic variation in the common mussel *Mytilus edulis* // Biochem. Genet. – 1977. – **15**. – P. 833–846.
- Almeida-Val V.M.F., Vala A.L., Duncan W.P., Souza F.C.A., Paula-Silva M.N., Land S. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels // Comp. Biochem. Physiol. – 2000. – **125**, N 2. – P. 219–226.
- Amado L.L., da Rosa C.E., Leite A.M., Moraes L. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects // Mar. Pollut. Bull. – 2006. – **52**. – P. 199–206.
- Andreani G., Carpenè E., Capranico G., Isani G. Metallothionein cDNA cloning, metallothionein expression and heavy metals in *Scapharca inaequivalvis* along the Northern Adriatic coast of Italy // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2011. – **74**, N 3. – P. 366–372.
- Anninsky B.E., Finenko G.A., Abolmasova G.I., Hubareva E.S., Svetlichny L.S., Bat L., Kideys A.E. Effect of starvation on the biochemical compositions and respiration rates of ctenophores *Mnemiopsis leidyi* and *Beroe ovate* in the Black Sea // J. Mar. Biol. Ass. UK. – 2005. – **85**. – P. 549–561.
- Arasu S.M., Sreenivasula-Reddy P. Changes in lipid peroxidation in the gill and muscle of the marine bivalve (*Perna viridis*) during exposure to cadmium and copper // Chem. Ecol. – 1995. – **11**, N 2. – P. 105–112.
- Asada S., Fukuda K., Oh M., Hamanishi C., Tanaka S. Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes // Inflamm. Res. – 1999. – **48**, N 7. – P. 399–403.
- Babior B.M. NADPH Oxidase: An Update // Blood. – 1999. – **93**, N 5. – P. 1464–1476.
- Bailly X., Vinogradov S. The sulfide binding function of annelid hemoglobins: relic of an old biosystem? // J. Inorganic Biochem. – 2005. – N 99. – P. 142–150.
- Beaumont A., Gjerdrem T., Moran P. Blue Mussel – *M. edulis* and Mediterranean mussel – *M. galloprovincialis* // 6th framework plan of the European commission:

Цитированная литература

- Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. – 2007. – P. 62–69.
- Bebbiano M.J., Machado L.M.* Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal // *Mar. Poll. Bull.* – 1997. – **34**, N 8. – P. 666–671.
- Bernhard K., Englert G., Meister W., Vecchi M., Renstrom B., Liaaen-Jensen S.* Carotenoids of the carotenoprotein asteriarubin. Optical purity of asterinic acid // *Helvetica Chimica Acta.* – 1982. – **65**, N 7. – P. 2224–2229.
- Beukema J.J.* Annual variation in the reproductive success and biomass of the major macrozoobenthic species living in a tidal flat area of the Wadden Sea // *Neth. J. Sea Res.* – 1982. – **16**. – P. 27–35.
- Bhosale P., Bernstein P.S.* Microbial xanthophylls // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – **68**, N 4. – P. 445–455.
- Bindu P.C., Babu P.* Surfactant-induced lipid peroxidation in a tropical euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus* (*Tilapia*) adapted to fresh water // *Indian J. Exp. Biol.* – 2001. – **39**, N 11. – P. 1118–1122.
- Bindu P.C., Philip B., Chandran R.V.* Lysosomal stability in *Oreochromis mossambicus* (Peters) on exposure to surfactants // *Indian J. Exp. Biol.* – 2005. – **43**, N 1. – P. 96–99.
- Birmelin C., Pipe R.K., Goldfarb P.S.* Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes // *Mar. Biol.* – 1999. – **135**, N 1. – P. 65–75.
- Bjerkeng B., Hertzberg S., Liaaen-Jensen S.* Carotenoids in food chain studies – V. Carotenoids of the bivalves *Modiolus modiolus* and *Pecten maximus* – structural, metabolic and food chain aspects // *Comp. Biochemi Physiol. Part B: Comp. Biochem.* – 1993. – **106**, N 2. – P. 243–250.
- Bjerkeng B., Hertzberg S., Liaaen-Jensen S.* Carotenoids in food chain studies. 5. Carotenoids of the bivalves *Modiolus modiolus* and *Pecten maximus* – structural, metabolic and food chain aspects // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1993. – **106B**, N 2. – P. 243–250.
- Boffi A., Bonaventura C., Bonaventura J., Cashion R., Chiancone E.* Oxidized dimeric *Scapharca inaequivalvis* hemoglobin. CO-driven perturbation of the redox equilibrium // *J. Biol. Chem.* – 1991. – **266**, N 27. – P. 17898–17903.
- Boffi A., Gattoni M., Santucci R., Vecchini P., Ascoli F., Chiancone E.* Structural and functional effects of selective chemical modifications of *Scapharca inaequivalvis* haemoglobins in relation to their unique assembly // *Biochem. J.* – 1987. – **241**. – P. 499–504.
- Boonruang P., Janekam V.* Distribution, density, biomass, and population bionomics of *Anadam granosa* (L.) in relation to environmental factors at Sapum Bay on the east coast of Phuket Island // *Thai Fish.* – 1983. – N 36. – P. 461–468.
- Borah S., Yadav R.N.S.* Biochemical and haematological responses to starvation in an air breathing fresh water teleost *Heteropneustes fossilis* (Bloch) // *Indian J. Fish.* – 1996. – **43**, N 3. – P. 307–311.
- Bosworth C.A., Chou C.W., Cole R.B., Rees B.B.* Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure // *Proteomics.* – 2005. – **5**, N 5. – P. 1362–1371.

Цитированная литература

- Boutilier R.G., West T.G., Pogson G.H., Mesa K.A., Wells J., Wells M.J.* Nautilus and the art of metabolic maintenance // *Nature*. – 1996. – **382**, N 591. – P. 534–536.
- Bowen K.L., Johannsson O.E., Smith R., Schlechtriem C., Arts M.T.* RNA/DNA and protein Indices in Evaluating Growth and Condition of Aquatic Organisms: A Review // *Ann. Conf. Great Lakes Res.* – 2005. – **48**. – P. 34–39.
- Brenko M., Legac M.* A review of bivalve species in the eastern Adriatic Sea. 2. *Pteromorphia (Arcidae and Noetidae)* // *Nat. Croat.* – 1996. – **5**, N 3. – P. 221–247.
- Britton G.* Structure and properties of carotenoids in relation to function // *J. Federation Am. Soc. Exp. Biol.* - 1995. – **9**, N 15. – P. 1551–1558.
- Broom M.J.* Community and production ecology of *Anadam granosa* (L.) with particular reference to its gastropod predators. – University of Malaya, Kuala Lumpur, 1980. – 349 p.
- Broom M.J.* The Biology and Culture of Marine Bivalve Molluscs of the Genus *Anadara* // *ICLARM Studies and Reviews*. – 1985. – N 12. – P. 1–37.
- Buckley L.Y.* Changes in RNA, DNA and protein content during ontogenesis in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and effect of starvation // *Fish. Bull.* – 1980. – **77**. – P. 703–708.
- Buckley L.Y.* RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea // *Mar. Biol.* – 1984. – N 80. – P. 291–298.
- Cancio I., Ibabe A., Cajaraville M.P.* Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussel *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1999. – **123C**. – P. 135–144.
- Canesi L., Ciacci C., Betti M., Gallo G.* Growth factor-mediated signal transduction and redox balance in isolated digestive gland cells from *Mytilus galloprovincialis* Lam. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2000. – **125C**, N 3. – P. 355–363.
- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G.* Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues // *Aquat. Toxicol.* – 1999. – **46**, N1. – P. 67–76.
- Canino M.F.* Effects of temperature and food availability on growth and RNA/DNA ratios of walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas) eggs and larvae // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 1994. – **175**, N 1. – P. 1–6.
- Carefoot T.H., Qian P-Y., Taylor B.E., West T.G., Osborne J.* Effect of starvation on blood-glucose and tissue-glycogen levels in the northern abalone *Haliotis kamtschatkana* // *J. Shellfish Res.* – 1992. – **11**, N 2. – P. 551.
- Carotenoids: Isolation and Analysis / Eds.: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. – Basel : Birkhäuser Verlag, 1995. – **1 A**. – 328 p.
- Carotenoids: Spectroscopy / Eds.: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. – Basel : Birkhäuser Verlag, 1995. – **1 B**. – 360 p.
- Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism / Eds.: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. – Basel : Birkhauser Verlag, 1998. – **3**. – 414 p.
- Carotenoids: Natural Functions / Eds.: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. – Basel : Birkhauser Verlag, 2008. – **4**. – 370 p.
- Carotenoids: Nutrition and Health / Eds.: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. – Basel : Birkhauser Verlag, 2009. – **5**. – 431 p.
- Carotenoids : Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties / Ed. Landrum J.T. – Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. – 544 p.

Цитированная литература

- Carpene E., Zurburg W., Cortesi P.* Biochemical effects of anaerobiosis in *Venus gallina* L. and *Scapharca inaequivalvis* (Bruguiere) // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* – 1985. – **61**, N 5. – P. 707–714.
- Carrington E.* Seasonal variation in the attachment strength of blue mussels: Causes and consequences // *Limnol. Oceanogr.* – 2002. – **47**, N 6. – P. 1723–1733.
- Carroll J.L.* Strategies of anaerobiosis in New Zealand infaunal bivalves: adaptations to environmental and functional hypoxia // *New Zeal. J. Mar. Freshwater Res.* – 1995. – **29**. – P. 137–146.
- Chandra M.P., Raghu P.R.* Concentration of petroleum hydrocarbons in bivalve, *Mytilopsis sallei* and in the harbor water of Visakhapatnam, east coast of India // *Indian J. Mar. Sci.* – 1998. – **27**. – P. 496 - 498.
- Cheng J.Y., Don-Paul M., Antia N.J.* Isolation of an unusually stable cis-isomer of alloxanthin from a bleached autolysed culture of *Chroomonas salina* grown photoheterotrophically on glycerol. Observations on cis-trans isomerization of alloxanthin // *J. Eukaryotic Microbiol.* - 1974. – **21**, N 5. – P. 761–768.
- Cheung C.C.C., Siu W.H.L., Richardson B.J., De Luca-Abbott S.B, Lam P.K.S.* Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis* // *Environ. Pollution.* – 2004. – **128**, N 3. – P. 393–403.
- Cheung C.C.C., Zheng G.J., Li A.M.Y. et al.* Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis* // *Aquat. Toxicol.* – 2001. – **52**. – P. 189–203.
- Chew S.F., Gan J., Ip Y.K.* Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud // *Physiol. Biochem. Zool.* – 2005. – **78**, N 4. – P. 620–629.
- Chiancone E., Drakenberg T., Forsen S.* Detection of anion-linked polymerization of the tetrameric hemoglobin from *Scapharca inaequivalvis* by super(35) Cl NMR spectroscopy // *FEBS Letters.* – 1988. – **233**, N 2. – P. 383–387.
- Chiancone E., Vecchini P., Verzili D., Ascoli F. Antonini E.* Dimeric and tetrameric hemoglobins from the bivalves *S. Inaequivalves*: Structural and Functional Properties // *J. Mol. Biol.* – 1981. – N 152. – P. 577–592.
- Clemmesen C. M.* The effect of food availability, age, or size on the RNA/DNA of individual weasured herring larval: laboratory calibration // *Mar. Biol.* – 1994. – **118**, N 3. – P. 377–382
- Cohen W.D., Nemhauser I.* Marginal bands and the cytoskeleton in blood cells of marine invertebrates / *Blood cells of marine invertebrates: experimental systems in cell biology and comparative physiology* / Cohen W.D. – Liss A.R.: New York, 1985. – P. 3–49.
- Comoglio L. I., Gaxiola G., Roque A., Cuzon G., Amin O.* The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* // *J. Shellfish Res.* – 2004. – **23**, N 1. – P. 243-249.
- Coombe D.R., Ey P.L., Jenkin C.R.* Self/non-self recognition in invertebrates // *Quarterly Review of Biology.* – 1984. – **59**. – P. 231.
- Corni M.G., Cattani O.* Aspects of gonadomorphogenesis and reproductive cycle of *Scapharca inaequivalvis* (Brug.) (Bivalvia; Arcidae) // *J. Shellfish Res.* – 1989. – **8**, N 2. – P. 335–344.

Цитированная литература

- Corni M.G., Trentini M. *Scapharca inaequalis* (Brug.) chromosomes // *Oebalia*. – 1988. – **14**, N S. – P. 107–110.
- Correia A.D., Costa H.M., Luis O.J., Livingstone D.R. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda) // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2003. – **289**, N 1. – P. 83–101.
- Cortesi P., Cattani O., Vitali G., Carpené E., de Zwaan A., van den Thillart G., Roos J., van Lieshout G., Weber R.E. Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequalis* to hypoxia and cadmium exposure: Erythrocytes versus other tissues // *Mar. Coastal Eutroph.* – 1992. – N Suppl. – P. 1041–1053.
- Cossu C., Doyotte A., Babut M., Exinger A., Vasseur P. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments // *Ecotoxicol. Environ. Safety*. – 2000. – **45**, N 4. – P. 106–121.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies // *Ecotoxicol. Environ. Safety*. – 1997. – **38**, N 2. – P. 122–131.
- Coyne K.J., Waite J.H. In search of molecular dovetails in mussel byssus: from the threads to the stem // *J. Exp. Biol.* – 2000. – **203**, N 9. – P. 1425–1431.
- Cuénot L. Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. *Arch. de Zool. Exp. et Gén.*, – 1891. – **2**, N 9. – P. 13–19.
- Cui L., Liu C., Lu Y. et al. Studies on mussels gills // *Shandong Fish. Qilu. Yuye*. – 1996. – **13**, N 5. – P. 11–14.
- Czeczuga B. Investigation of carotenoids in some faunal elements of the Adriatic sea. IV-mollusks // *Hydrobiologia*. – 1976. – **51**, N 1. – P. 71–75.
- Da Ros L., Nasci C., Marigomez I., Soto M. Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy // *Mar. Environ. Res.* – 2000. – **50**. – P. 417–423.
- Da Ros L., Nasci C., Campesan G., Sartorello P., Stocco G., Menetto A. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and cadmium in the digestive gland of mussel, *Mytilus* sp. // *Mar. Environ. Res.* – 1995. – **39**, N 1-4. – P. 321–324.
- Dagg M.J., Littlepage J.L. Relationships between growth rate and RNA, DNA, protein and dry weight in *Artemia solina* and *Euchaeta elongata* // *Mar. Biol.* – 1972. – N 17. – P. 162–170.
- Dahlhoff E.P., Menge B.A. Influence of phytoplankton concentration and wave exposure on the ecophysiology of *Mytilus californianus* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1996. – **144**. – P. 97–107.
- Dahlhoff E.P., Stillman D.X., Menge B.A. Metabolic Activity of Ecologically Important Rocky Intertidal Invertebrates Along Environmental Gradients // *Symp. Physiological Ecology of Rocky Intertidal Organism (Anaheim 2 - 7 January 2002)*. – Anaheim, California, 2002.
- Dales R.P., Dixon L.R.J. Polychaetes /Invertebrate blood cells / Ratcliffe N.A., Rowley A.F. – Academic Press: New York, 1981. – **1**. – P. 35–74.
- Davies A., Khare A., Mallams A.K., Massy-Westropp R.A., Moss G.P., Weedon B.C.L. Carotenoids and related compounds. Part 38. Synthesis of (3RS,3'RS)-alloxanthin

Цитированная литература

- and other acetylenes // J. Chem. Soc., Perkin Translation 1. – 1984. – P. 2147–2157.
- Del Campo J.A., Moreno J., Rodríguez H., Vargas M.A., Rivas J., Guerrero M.G.* Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta) // J. Biotechnol. – 2000. – **76**, N 1. – P. 51–59.
- Di Giulio R.T., Washburn P.C., Wenning R.J., Winston G.W., Jewell C.S.* Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress // Environ. Toxicol. Chem. – 1989. – **8**. – P. 1103–1123.
- Dickinson D.A., Forman H.J.* Cellular glutathione and thiols metabolism // Biochem. Pharmacol. – 2002. – **64**. – P. 1019–1026.
- Dortch Q., Roberts T. L.* RNA:DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1983. – N 13. – P. 61–71.
- Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.-C., Babut M., Vasseur P.* Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus* // Aquat. Toxicol. – 1997. – **39**, N 2. – P. 93–110.
- Esteveza M.S., Abele D., Puntarulo S.* Lipid radical generation in polar (*Laternula elliptica*) and temperate (*Mya arenaria*) bivalves // Comp. Biochem. Physiol Part B: Biochem. Molecular Biol. – 2002. – **132**, N 4. – P. 729–737.
- Eugster C.H.* History: 175 years of carotenoid chemistry // Carotenoids: Isolation and analysis / Eds. : G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – Basel, 1995. – **1**. – P. 1–11.
- Farley C.A.* Histochemistry as a tool for examining possible pathologic cause-and-effect relationships between heavy metal and inflammatory lesions in oysters, *Crassostrea virginica* // Mar. Environ. Res. – 1988. – **24**, N 1–4. – P. 271–275.
- Fiksdahl A., Hallenstvet M., Bèress L., Liaaen-Jensen S.* Animal carotenoids: Identity of sulcatoxanthin and peridinin // Biochem. System. Ecol. – 1979. – **7**, N 2. – P. 173–174.
- Fiksdahl A., Tauber J.D., Liaaen-Jensen S., Saucy G., Weber G.F.* Steric Stability of Acetylenic Carotenoids // Acta Chem. Scand. Ser. B: Organic Chem. Biochem. – 1979. – **33**. – P. 192–196.
- Fisher L.R., Kon S.K., Thompson S.Y.* Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates: IV. Mollusca: Loricata, Lamellibranchiata, Gastropoda // J. Mar. Biol. Assoc. UK. – 1956. – **35**, N 1. – P. 41–61.
- Fontaine A.R., Hall B.D.* The haemocyte of the holothurian *Eupentacta quinquesemita*: ultrastructure and maturation // Can. J. Zool. – 1981. – **59**. – P. 1884–1891.
- Foster G.D., Moon T.W.* Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*): A study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size // Physiol. Zool. – 1991. – **64**, N 1. – P. 259–275.
- Foster R., Berlin W.H.* Fertilization of eggs of Lake Michigan lake trout *Salvelinus namaycush* in lake water: Effect of PCBs (Aroclor 1254) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1997. – **59**, N 3. – P. 460–466.
- Francis G.W., Upadhyay R.R., Liaaen-Jensen S.* Animal Carotenoids: The carotenoids of *Asterias rubens* – Asterinsure // Acta Chem. Scandinavica. – 1970. – **24**, N 8. – P. 3050–3052.

Цитированная литература

- Frolov A.V., Pankov S.L. The effect of starvation on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. – 1992. – **72**, N 2. – P. 343–356.
- Fujiwara Y., Maoka T., Ookubo M., Matsuno T. Crassostreaxanthin A and B, novel marine carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas* // Tetrahedron Letters. – 1992. – **33**, N 34. – P. 4941–4944.
- Funes V., Alhama J., Navas J.I., López-Barea J., Peinado J. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral // Environ. Pollution. – 2006. – **139**, N 2. – P. 214–223.
- Furuta H., Ohe M., Kajita A. Subunit structure of hemoglobins from erythrocytes of the blood clam, *Anadara broughtonii* // J. Biochem (Tokyo). – 1977. – **82**. – P. 1723–1730.
- Gabbott P.A. Energy metabolism // Marine mussels: the ecology and physiology. – Cambridge; London; New York, 1976. – P. 293–317.
- Gamble S.C., Goldfarb P.S., Porte C., Livingstone D.R. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*) // Mar. Environ. Res. – 1995. – **39**. – P. 191–195.
- Gao L., Chen L., Song B. Effect of starvation and compensatory growth on feeding, growth and body biochemical composition in *Acipenser schrenckii* juveniles // J. Fish. China. – 2004. – **28**, N 3. – P. 279–284.
- Gao L., Chen L., Zhao X., Zhuang P. Starvation and compensatory growth of *Acipenser schrenckii* juveniles - effects on digestive organs structure and digestive enzymes activity // J. Fish. Sci. China. – 2004. – **11**, N 5. – P. 413–419.
- Garcia Martinez P., Hajos A.K.D., Livingstone D.R., Winston G.W. Metabolism and mutagenicity of 4-nitroquinoline N-oxide by microsomes and cytosol of digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* L. // Mar. Environ. Res. – 1992. – **34**. – P. 303–307.
- Garcia Martinez P., Livingstone D.R. Benzo[a]pyrene-dione stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. // Mar. Environ. Res. – 1995. – **39**, N 1–4. – P. 185–189.
- Garcia-Segura L.M., Martines-Rodriguez R., Toledano A. Etude histochemique de l'activité aspartate aminotransférase dans la moëlle, le bulbe et les noyaux cérébelleux centraux de quelques vertébrés // Z. Mikrosk. Anat. Forsch. – 1976. – **90**, N 2. – S. 248–260.
- Glomski C.A., Tamburlin J. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. II. The early or invertebrate prototypes // Histol. Histopathol. – 1990. – N 5. – P. 513–525.
- Gomoiu M.T. *Scapharca inaequivalvis* (Bruguere), a new species in the Black Sea // Cercet. Mar. Rech. Mar. – 1984. – N 17. – P. 131–141.
- Goodwin T. W. The Biochemistry of the Carotenoids: Animals. – London; New York: Chapman and Hall, 1984. – 224 p.
- Gorinstein S., Moncheva S., Katrich E., Toledo F., Arancibia P., Goshev I., Trakhtenberg S. Antioxidants in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as an indicator of Black Sea coastal pollution // Mar. Poll. Bull. – 2003. – **46**. – P. 1317–1325.
- Gravato C., Oliveira M., Santos M.A. Oxidative stress and genotoxic responses to resin acids in Mediterranean mussels // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2005. – **61**, N 2. – P. 221–229.

Цитированная литература

- Guderley H., Lapointe D., Bedard M., Dutil J.-D. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. // Comp. Biochem. Physiol., – 2003. – **135A**, N 2. – P. 347–356.
- Guhl W. Safety evaluation of detergent formulations relevant to the environment // Meeting of the GDCh-Special Group Waschmittelchemie N°13, Würzburg, Allemagne, 03 of May 1999. – Würzburg, 1999. – **36**, N 6. – P. 360–363.
- Gunderson L., Holling C.S. Panarchy: understanding transformations in human and natural systems. – Washington: Island Press, 2002. – 450 p.
- Ha B.S., Kang D.S., Kim Y.G., Kim K.S. Variation in carotenoid pigment and lipids of the arkshell, (*Anadara broughtonii*) according to the environmental factors of the growing area // Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. – 1989. – **18**, N 1. – P. 71–92.
- Habe T. The arcid subfamily Anadarinae in Japan and its adjacent areas (Mollusca) // Bull. Natn. Sci. Mus. – 1965. – **8**, N1. – P.71–85.
- Hall J.R., Short C.E., Driedzic W.R. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose // J. Exp. Biol. – 2006. – **209**, N 22. – P. 4490–4502.
- Hammen C.S. Aminotransferase activities and amino acid excretion of bivalve mollusks and brachiopods // Comp. Biochem. Physiol. – 1968. – **26**. – P. 697–705.
- Hanlon M.C., Seybert D.W. The pH dependence of lipid peroxidation using water-soluble azo initiators // Free Rad. Biol. Med. – 1997. – **23**, N 5. – P. 712–719.
- Hans Z. On the use of carotenoid stratigraphy in lake sediments for detecting past developments of phytoplankton // Limnol. Oceanography. – 1981. – **26**, N 5. – P. 970–976.
- Hashimoto H. The 15th International Symposium on Carotenoids / Arc. Biochem. Biophys. – 2009. – **483**, N 2. – P. 145.
- Haugan J. A., Englert G., Aakermann T., Glinz E., Liaaen-Jensen S. Algal carotenoids 58. Isomerization studies of peridinin // Acta Chem. Scandinavica. – 1994. – **48**. – P. 769-779.
- Hayashi Y. S. Alanine aminotransferase from gill tissue of the brackish water bivalve *Corbicula japonica* (Prime): subcellular localization and some enzymatic properties // Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1993. – **170**. – P. 45–54.
- Hayward P.J. Lophophorates / Invertebrate blood cells / Ratcliffe N.A., Rowley A.F. – Academic Press: New York, 1981. – **2**. – P. 491–509.
- Hearing V.J., Ekel T.M. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation // Biochem. J. – 1976 – **157**. – P. 549–557.
- Hertzberg S., Partali V., Liaaen-Jensen S. Animal carotenoids. 32. Carotenoids of *Mytilus edulis* (Edible Mussel) // Acta Chem. Scandinavica. Ser. B: Organic Chem. Biochem. – 1988. – **42**. – P. 495–503.
- Hetzel E.W., Wright D.A. The use of RNA/DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the american oyster, *Crassostrea virginica* // Estuaries. – 1983. – **6**, N 3. – P. 259–265.
- Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia // Science. – 1986. – **231**. – P. 234–241.
- Hochachka P.W., Fields J., Mustafa T. Animal Life Without Oxygen: Basic Biochemical Mechanisms// Amer. Zool. – 1973. – **13**. – P. 543–555.

Цитированная литература

- Holden J.A., Pipe R.K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis* // J. Mar. Biol. Assoc. UK. – 1994. – **74**, N 2. – P. 287–299.
- Holland B., Brown J., Buss D.H. Fish and Fish Products // Third Supplement to the Fifth Edition of McCance and Widdowson's The Composition of Foods. 135 Seiten, zahlr. Tab. Roy. Soc. Chem. Ministry Agriculture, Fisheries and Food, Cambridge, 1993. – 1994. – **38**, N 4. – P. 451–452.
- Holling C.S. Understanding the Complexity of Economic, Ecological, and Social Systems // Ecosystems. – 2001. – **4**. – P. 390–405.
- Houchin D.N., Munn J.I., Parnell B.L. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area // Blood. – 1958. – N 13. – P. 1185–1191.
- Hourdez St., Weber R.E. Molecular and functional adaptations in deep-sea hemoglobins // J. Inorganic Biochem. – 2005 – **99**. – P. 130–141.
- Inoue K., Othe S. Adhesive protein cDNA of *Mytilus galloprovincialis* encodes decapeptide repeats but no hexapeptide motif // Biol. Bull. – 1994. – **186**: – P. 349–355.
- Inoue K., Waite H., Matsuoka M., Odo S., Harayama S. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus* // Biol. Bull. – 1995. – **189**. – P. 370–375.
- Irato P., Piccinni E., Cassini A., Santovito G. Antioxidant responses to variations in dissolved oxygen of *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum*, two bivalve species from the lagoon of Venice // Mar. Pollut. Bull. – 2007. – **54**, N 7. – P. 1020–1030.
- Isani G., Cattani O., Carpena E., Tacconi S., Cortesi P. Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* // Comp. Biochem. Physiol. – 1989. – **93 B**. – P. 193–200.
- Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Bjørnland T. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments // Phytoplankton pigments in oceanography : guidelines to modern methods – Paris, 1997. – P. 449–559. (Monographs on Oceanographic methodology; 10).
- Jensen F.B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport (review) // Acta Physiol. Scand. – 2004. – **182**, N 3. – P. 215–227.
- Jewell C.S.E., Winston G.W. NAD(P)H-dependent oxidation of the hydroxyl radical scavenging agent 2-keto-4-thiomethylbutyric acid (KMBA) by microsomal fractions from hepatopancreas of the red swamp crawfish, *Procambarus clarkia* // Mar. Environ. Res. – 1988. – **24**, N 1–4. – P. 295–299.
- Jimenez B.D. Response of mixed-function oxidase system to toxicant dose, food and acclimation temperature in the bluegill sunfish // Mar. Environ. Res. – 1988. – **24**, N 1–4. – P. 45–49.
- Jin E.S., Polle J.E.W., Lee H.K., Hyun S.M., Chang M. Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application // J. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – **13**. – P.165–175.
- Johnson A.G., Utter F.M. Electrophoretic variants of aspartate aminotransferase of the bay mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. – 1973. – **44**. – P. 317–323.

Цитированная литература

- Joseph-Silverstein J., Cohen W.D.* The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. III. Marginal band function in mature cells // *J. Cell Biol.* – 1984. – **98**. – P. 2118–2125.
- Ju Z., Wells M.C., Heater S.J., Walter R.B.* Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia // *Comp. Biochem. Physiol. C.* – 2007. – **145**, N 1. – P. 134–144.
- Juinio M.A., Gobb J.S.* Estimation of recent growth of field-caught postlarval american lobsters, *Hamarus americanus*, from RNA:DNA ratios // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1994. – **51**, N 2. – P. 284–297.
- Kantha S.S.* Carotenoids of edible molluscs. A review // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.* – 1989. – **93**, N3. – P. 665–671.
- Karnaikhov V.N.* Carotenoids: recent progress, problems and prospects // *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.* – 1990. – **95**, N 1. – P. 1–20.
- Karrer P.* Carotenoids / P. Karrer, E. Jucker ; Transl. from Germany and rev. E. A. Braude. – New York; Amsterdam; London; Brussels: Elsevier Pub. Co., 1950. – 384 p.
- Katagiri K., Maoka T., Matsuno T.* Carotenoids of shellfishes—VIII. Comparative biochemical studies of carotenoids in three species of spindle shell, *Fusinus perplexus*, *F. perplexus ferrugineus* and *F. forceps* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.* – 1986. – **84**, N 4. – P. 473–476.
- Khessiba A., Hoarau P., Gnassia-Barelli M., P. Aissa P., Romeo M.* Biochemical response of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2001. – **40**, N 2. – P. 222–229.
- Kim K-I., Grimshaw T.W., Kayes T.B., Amundson C.H.* Effect of fasting or feeding diets containing different levels of protein or amino acids on the activities of the liver amino acid-degrading enzymes and amino acid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquaculture.* – 1992. – **107**, N 1. – P. 89–105.
- Kitamura A., Tanaka J., Higa T.* New cytotoxic carotenoids from the sponge, *Phakellia stelliderma* // *J. Nat. Toxins.* – 1996. – **5**. – P. 219–224.
- Kluytmans J.H., Zandee D.I.* Comparative study of the formation and excretion of anaerobic fermentation products in bivalves and gastropods // *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* – 1983. – **75**, N 4. – P. 72–732.
- Konishi I., Hosokawa M., Sashima T., Maoka T., Miyashita K.* Suppressive effects of alloxanthin and diatoxanthin from *Halocynthia roretzi* on LPS-induced expression of pro-inflammatory genes in RAW264.7 cells // *J. Oleo Sci.* – 2008. – **57**, N 3. – P. 181–189.
- Konishi I., Hosokawa M., Sashima T., Kobayashi H., Miyashita K.* Halocynthiixanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells // *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* – 2006. – **142**, N 1–2. – P. 53–59.
- Kotake-Nara E., Asai A., Nagao A.* Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells // *Cancer Letters.* – 2005. – **220**, N 1. – P. 75–84.
- Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K., Nagao A.* Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells // *J. Nutr.* – 2001. – **131**, N 12. – P. 3303–3306.
- Krisky N.J.* The biological properties of carotenoids // *Pure Appl. Chem.* – 1994. – **66**, N

Цитированная литература

5. – P. 1003–1010.
- Kumar C.S., Ganesan P., Suresh P.V., Blaskar N.* Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds – A review // *J. Food Sci. Technol.* – 2008. – **45**, N 1. – P. 1–13.
- Lai J.C.C., Kakuta I., Mok H.O L., Rummer J.L., Randall D.* Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin level in rainbow trout kidney and spleen // *J. Exp. Biol.* – 2006. – **209**. – P. 2734–2738.
- Lane H.C., Tianang D.* Effect of hypoxia and hyperoxia on rainbow trout red cells // *Amer. Zool.* – 1992. – **32**, N 5. – P. 170 A.
- Larade K., Storey K.* Arrest of transcription following anoxic exposure in a marine mollusc // *Mol. Cell Biochem.* – 2007. – **15**. – P. 17–35.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M.* Principles of Biochemistry (3rd ed.). – New York: Worth Publishers, 1993. – 729 p.
- Leick V.* Ration beetween contents of DNA, RNA and protein in different microorganisms as a function of maximal growth rate // *Nature.* – 1968. – **217**, N 5134. – P. 1153–1156.
- Lemaire P., Livingstone D.R.* Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis* // *Trends Comp. Biochem. Physiol.* – 1993. – **1**. – P. 1119–1150.
- Liaaen-Jensen S.* Studies on algal carotenoids // *Pure Appl. Chem.* – 1989. – **61**, N 3. – P. 369–372.
- Liaaen-Jensen S.* Marine carotenoids – selected topics // *New J. Chem.* – 1990. – **14**. – P. 747–759.
- Liaaen-Jensen S.* Marine carotenoids: recent progress // *Pure Appl. Chem.* – 1991. – **63**, N 1. – P. 1–12.
- Liaaen-Jensen S.* Carotenoids in Food Chains // *Carotenoids – Vol. 3 : Biosynthesis and Metabolism / Eds. : G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander.* – Basel : Birkhauser Verlag, 1998. – Chapter 8. - P. 360–371.
- Lim C.F.* A comparative study of the ciliary feeding mechanisms of *Anadara* species from different habitats // *Biol. Bull. Woods Hole Oceanogr. Inst.* – 1966. – **130**. – P.106–117.
- Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Pascariello M.F., Marinosci L., Schettino T.* Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area // *Mar. Pollut. Bull.* – 2003. – **46**, N 3. – P. 324–330.
- Livingstone D.R.* Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom // *Amer. Zool.* – 1991. – **31**. – P. 522–534.
- Livingstone D.R.* Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // *Mar. Pollut. Bull.* – 2001. – **42**, N 8. – P. 656–666.
- Livingstone D.R., Archibald S., Chipman J.K., Marsh J.W.* Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 1992. – **91**. – P. 97–104.
- Livingstone D.R., Chipman J.K.; Lowe D.M., Minier C., Mitchelmore C.L., Moore M.N., Peters L.D., Pipe R.K.* Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and

Цитированная литература

- immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids // Intern. J. Environ. Pollut. – 2000. – **13**, N 1-6. – P. 56–91.
- Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A.A., Peters L., Bucke D., Law R.J.* Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals // Mar. Poll. Bull. – 1993. – **26**, N 11. – P. 602–606.
- Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A.A., Peters L., Porte C., Fitzpatrick P.J., Forlin L., Nasci C., Fossato V., Wootton N., Goldfarb P.* Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy: biochemical studies // Mar. Environ. Res. – 1995. – **39**, N 1–4. – P. 235–240.
- Livingstone D.R., Lips F., Garcia Martinez P., Pipe R.K.* Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis* // Mar. Biol. – 1992. – **112**, N 2. – P. 265–276.
- Livingstone D.R., Martinez G.P., Michel X., Ribera D., Winston G.W.* Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks // Funct. Ecol. – 1990. – **4**, N 3. – P. 415–424.
- Livingstone D.R., Martinez G.P., Stegeman J.J., Winston G.W.* Benzo[a]pyrene metabolism and aspects of oxygen radical generation in the common mussel, *Mytilus edulis* L. // Aquat. Toxicol. – 1988. – **15**. – P. 231–236.
- Lohr M., Wilhelm C.* Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**. – P. 8784–8789.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 266. – P. 75.
- Lucas J.M., Vaccaro E., Waite J.H.* A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* // J. Exp. Biol. – 2002. – **205**, N 12. – P. 1807–1817.
- Lushchak V.I., Smirnova Yu. D., Storey K.B.* AMP-deaminase from sea scorpion white muscle properties and redistribution under hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. – 1998. – **19 B**. – P. 611–618.
- Madsen T., Boyd H.B., Nylén D., Pedersen A.R., Petersen G.I., Simonsen F.* Environmental and health assessment of substances in household detergents and cosmetic detergent products [Электронный ресурс] / – 2001. – 240 p. <http://www2.mst.dk/udgiv/Publications/2001/87-7944-596-9/pdf/87-7944-597-7.pdf>.
- Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Miyashita K.* Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice // J. Agricult. Food Chem. – 2007. – **55**, N 19. – P. 7701–7706.
- Maoka T.* Isolation and Structural Elucidation of Three New Acetylenic Carotenoids from the Japanese Sea Mussel *Mytilus coruscus* // Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher. – 1988. – **54**, N 8. – P. 1443–1447.
- Maoka T.* A new apocarotenoid from marine shellfish // J. Nat. Prod. – 1997. – **60**, N 6. – P. 616–617.
- Maoka T.* Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants //

Цитированная литература

- Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2009. – **483**, N 2. – P. 191–195.
- Maoka T. Carotenoids in Marine Animals // Mar. Drugs. – 2011. – **9**, N. 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. – **13**. – P. 10–17.
- Maoka T., Akimoto N., Murakoshi M., Sugiyama K., Nishino H. Carotenoids in clams, *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix petechialis* // J. Agricult. Food Chem. – 2010. – **58**, N 9. – P. 5784–5788.
- Maoka T., Akimoto N., Terada Y., Komemushi S., Harada R., Sameshima N., Sakagami Y. Structure of minor carotenoids from the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci* // J. Nat. Prod. – 2010. – **73**, N 4. – P. 675–678.
- Maoka T., Akimoto N., Tsushima M., Komemushi S., Mezaki T., Iwase F., Takahashi Y., Sameshima N., Mori M., Sakagami Y. Carotenoids in marine invertebrates living along the Kuroshio Current Coast // Mar. Drugs. – 2011. – **9**, N 8. – P. 1419–1427.
- Maoka T., Akimoto N., Yim M.-J., Hosokawa M., Miyashita K. A new C₃₇-skeletal carotenoid from the clam, *Paphia amabilis* // J. Agricult. Food Chem. – 2008. – **56**, N 24. – P. 12069–12072.
- Maoka T., Ando S. Isolation of purple nor-carotenoid, 2,3-dihydroserethrin, from crawfish *Procambarus clarkii* // Fisher. Sci. – 2007. – **73**, N 4. – P. 967–968.
- Maoka T., Etoh H. Some Biological Functions of Carotenoids, Chapter 4.2 // Functional Foods of the East / Edited by Fereidoon Shahidi. CRC Press, 2010. – P. 85–97.
- Maoka T., Etoh T., Borodina A.V., Soldatov A. A. A series of 19 or 19'-Hexanoyloxy carotenoids from the sea mussel, *Mytilus galloprovincialis*, grown in the Black Sea of Ukraine // J. Agricult. Food Chem. – 2011. – **59**, N 24. – P. 13059–13064.
- Maoka T., Fujiwara Y. Absolute configuration of mytiloxanthin and 9-E- mytiloxanthin // J. Jap. Oil Chem. Soc. – 1996. – **45**, N 7. – P. 667–670.
- Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. Carotenoids in three species of *Corbicula* clams, *Corbicula japonica*, *Corbicula sandai*, and *Corbicula* sp. (Chinese freshwater *Corbicula* clam) // J. Agricult. Food Chem. – 2005. – **53**, N 21. – P. 8357–8364.
- Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. Structures of new carotenoids with a 3,4-dihydroxy-βend group from the oyster *Crassostrea gigas* // Chem. Pharm. Bull. – 2005. – **53**, N 9. – P. 1207–1209.
- Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. Characterization of fucoxanthin and fucoxanthinol esters in the Chinese surf clam, *Macra chinensis* // J. Agricult. Food Chem. – 2007. – **55**, N 4. – C. 1563–1567.
- Maoka T., Hashimoto K., Akimoto N., Fujiwara Y. Structures of five new carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas* // J. Nat. Prod. – 2001. – Vol. 64, iss. 5. – P. 578–581.
- Maoka T., Katsuyama M., Kaneko N., Matsuno T. Stereochemical investigation of carotenoids in the antarctic krill *Euphausia superba* // Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher. – 1985. – **51**. – P. 1671–1673.
- Maoka T., Matsuno T. Isolation and Structural Elucidation of Three New Acetylenic Carotenoids from the Japanese Sea Mussel *Mytilus coruscus* // Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher. – 1988. – **54**, N 8. – P. 1443–1447.
- Maoka T., Matsuno T. Metabolism of carotenoids in terrestrial snail *Euhadra Callizona*

Цитированная литература

- amaliae // *Comp. Biochem. Physiol Part B : Comp. Biochem.* – 1989. – **92**, N 1. – P. 41–43.
- 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. – **61**, N 4. – P. 69 – 74.
- Maoka T., Tsushima M., Matsuno T. New acetylenic carotenoids from the starfishes *Asterina pectinifera* and *Asterias amurensis* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.* – 1989. – **93**, N 4. – P. 829–834.
- Margalith P.Z. Production of ketocarotenoids by microalgae // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – **51**, N 4. – P. 431–438.
- Martinez G., Torres M., Uribe E. Biochemical composition of broodstock and early juvenile *Chilean scallops*, *Argopecten purpuratus* L. held in two different environments // *J. Shellfish Res.* – 1992. – **11**. – P. 307 – 313.
- Matsuno T. Aquatic animal carotenoids // *Fisher. Sci.* – 2001. – **67**, N 5. – P. 771–783.
- Matsuno T., Hiraoka K., Maoka T. Carotenoid in the gonad of scallop // *Nippon Suisan Gaku.* – 1981. – **47**. – P. 383–390. (In Japanese).
- Matsuno T., Katagiri K, Maoka T. Carotenoids of the spindle shell *Fusinus perplexus* // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher.* – 1984. – **50**, N 9. – P. 1583–1588.
- Matsuno T., Katagiria K., Maoka T., Komori T. Novel reductive metabolic pathways of 4-oxo- β -end group in carotenoids of the spindle shell *Fusinus perplexus* // *Comp. Biochem. Physiol Part B: Comp. Biochem.* – 1985. – **81**, N 4. – P. 905–908.
- Matsuno T., Maoka T. Isolation of diatoxanthin, pectenoxanthin, pectenolone, and a new carotenoid, 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- β -carotene from arkshell and related three species of bivalves // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher.* – 1981. – **47**, N 4. – P. 495–499. (In Japanese).
- Matsuno T., Maoka T., Katagiri K., Komori T. A new carotenoid, isorenieradicistene from the sea sponge *Suberites sericeus* // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher.* – 1984. – **50**, N 6. – P. 1071–1075.
- Matsuno T., Tsushima M. Carotenoids of shellfishes—X. Reductive metabolic pathways of echinenone and fritschiellaxanthin in the spindle shell *Fusinus perplexus* // *Comp. Biochem. Physiol Part B: Comp. Biochem.* – 1989. – **92**, N 1. – P. 189–193.
- Mayrand E., Pellerin-Massicotte J., Vincent B. Small scale variability of biochemical indices of growth in *Mya arenaria* (L) // *J. Shellfish Res.* – 1994. – **13**. – P. 199–205.
- Megurk M.D., Kusser W.C. Comparison of three methods of measuring RNA and DNA Concentrations of individual Pacific Herring *Clupea pallasii*, Larval // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1992. – **49**. – P. 967–974.
- Meinardus-Hager G., Gäde G. The pyruvate branchpoint in the anaerobic energy metabolism of the jumping cockle *Cardium tuberculatum* L.: D-lactate formation during environmental anaerobiosis versus octopine formation during exercise // *Exp. Biol.* – 1986. – **45**, N 2. – P. 91–110.
- Menge B.A., Daley B.A., Lubchenco J. Top-down and bottom-up regulation of New Zealand rocky intertidal communities // *Ecol. Monogr.* – 1999. – **69**. – P. 297–330.
- Mercadante A.Z. New carotenoids: recent progress // *Pure Appl. Chem.* – 1999. – **71**, N

Цитированная литература

12. – P. 2263–2272.
- Miglavs I., Jobling M.* Effect of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus* with particular respect to compensatory growth // J. Fish. Biol. – 1989. – **34**. – P. 947–957.
- Miki W.* Biological functions and activities of animal carotenoids // Pure Appl. Chem. – 1991. – **63**, N 1. – P. 141–146.
- Mistri M., Rossi R., Ceccherelli V.U.* Growth and production of the ark shell *Scapharca inaequivalvis* (Bruguière) in a lagoon of the Po river delta // Mar. Ecol. – 1988. – **9**, N 1. – P. 35–49.
- Mitton J. B.* Shell color and pattern variation in *Mytilus edulis* and its adaptive significance. // Chesapeake Sci. – 1977. – **18**, N 4. – P. 387–390.
- Mochimaru M., Masukawa H., Maoka T., Mohamed H.E., Vermaas W.F.J., Takaichi S.* Substrate specificities and availability of fucosyltransferase and β -Carotene hydroxylase for myxol 2-fucoside synthesis in *Anabaena sp.* strain PCC 7120 compared with *Synechocystis sp.* Strain PCC 6803 // J. Bacteriol. – 2008. – **190**, N 20. – P. 6726–6733.
- Mommsen Th.P., French C.J., Hochachka P.W.* Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon // Can. J. Zool. – 1980. – **58**. – P. 1785–1799.
- Moore M.N.* Cellular- and histopathological effects of a pollutant gradient – summary // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1988. – **46**. – P. 109–110.
- Moore M.N.* Molecular and cellular pathology: summary // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1992. – **91**. – P. 117–119.
- Moore M.N., Pipe R.K., Farrar S.V.* Induction of lysosomal lipid accumulation and fatty degeneration by polycyclic aromatic hydrocarbons in molluscan digestive cells // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1988. – **24**, N 1–4. – P. 352–353.
- Morello E.B., Solustri C., Frogliani C.* The alien bivalve *Anadara demiri* (Arcidae): a new invader of the Adriatic Sea, Italy // J. Mar. Biol. Ass UK. – 2004. – **84**, N 5. – P. 1057–1064.
- Morse D.E., Duncan H., Hooker N., Morse A.* Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase // Science. – 1976. – **196**. – P. 298–300.
- Morton B.S.* The biology and functional morphology of the twisted ark *Trisidos semitorta* (Bivalvia: Arcacea) with a discussion on shell "torsion" in the genus // Malacologia. – 1983. – **23**, N 2. – P. 375–396.
- Moss S.M.* Use of nucleic acid as indicators of growth in juvenile shrimp // Mar. Biol. – 1994. – **120**, N 3. – P. 359–367.
- Mozzarelli A., Bettati S., Rivetti C., Rossi G.L., Colotti G., Chiancone E.* Cooperative oxygen binding to *Scapharca inaequivalvis* hemoglobin in the crystal // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, N 7. – P. 3627–3632.
- Myasoedova K.N., Arutyunyan A.M., Magretova N.N.* Phenomenon of activation of cytochrome P450 by nonionic detergents // Biosci. Rep. – 2006. – **26**, N 1. – P. 69–78.
- Nasci C., Da Ros L., Campesan G., Van Vleet E.S., Salizzato M., Sperti L.* Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments // Mar. Poll. Bull. – 1999. – **39**, N 1–12. – P. 255–260.

Цитированная литература

- Nasci C., Da-Ros L., Campesan G., Fossato V.U.* Assessment of the impact of chemical pollutants on mussel, *Mytilus galloprovincialis*, from the Venice Lagoon, Italy // *Mar. Environ. Res.* – 1998. – **46**, N. 1-5. – P. 279–282.
- Nawkirk G.F.* Genetics of shell colour in *Mytilus edulis* (L.) and the association of growth rate with shell colour // *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* – 1980. – **47**, N 1. – P. 89–94.
- Newel R., Thompson R.* Reduced clearance rates associated with spawning in the mussel, *Mytilus edulis* (L) (Bivalvia, Mytilidae) // *Mar. Biol. Lett.* – 1984. – **5**, N 1. – P. 21–23.
- Nicholson S.* Ecophysiological aspects of cardiac activity in the subtropical mussel *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2002. – **267**, N 2. – P. 207–222.
- Nicholson S., Morton B.* The hypoxia tolerances of subtidalmarine bivalves from Hong Kong. // *Proc. 10th Int. Mar. Biol. Workshop: The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China.* – 2000. – P. 229–239.
- Nikinmaa M.* Adrenergic control of oxygen transport in salmonids // *Fischerei-Forschung.* – 1991. – **29**, N 3. – P. 64–65.
- Nishikimi M., Appaji N., Yagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1972. – **46**. – P.849–854.
- Nishino H., Murakoshi M., Tokuda H., Satomi Y.* Cancer prevention by carotenoids // *Arc. Biochem. Biophys.* – 2009. – **483**, N 2. – P. 165–168.
- Niyogi S., Biswas S., Sarker S., Datta A.G.* Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences // *Sci. Total Envir.* – 2001. – **281**, N 1-3. – P. 237-246.
- Niyogi S., Biswas S., Sarker S., Datta A.G.* Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences // *Sci. Tot. Environ.* – 2001. – **281**. – P. 237–246.
- Novac A., Fusu L.* The phenotypic structure of a *Mytilus galloprovincialis* Lmk population from the Romanian Black Sea shore // *Analele Științifice ale Universității “Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară.* – 2006. – **7**, N 1. – P. 235–240.
- Ochi O.* Blood pigments and erythrocytes found in some marine annelid // *Mem. Ehime Univ. Sci. Ser. B (Biol.).* – 1969. – **6**. – P. 23–131.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Analyt. Biochem.* – 1979. – **95**. – P. 351-358.
- Ohnoki S., Mitomi Y., Hata R., Satake K.* Heterogeneity of hemoglobin from arca (*Anadara satowi*) // *J. Biochem.* – 1973. – **73**. – P. 717–725.
- Okuma E., Watanabe K., Abe H.* Distribution of free D-amino acids in bivalve mollusks and the effects of physiological conditions on the levels of D- and L-alanine in the tissues of the hard clam, *Meretrix lusoria* // *Fish. Sci.* – 1998. – **64**, N 4. –P. 606–611.
- Ookubo M., Matsuno T.* Carotenoids of sea squirts - II. Comparative biochemical studies of carotenoids in sea squirts // *Comp. Biochem. Physiol Part B: Comp. Biochem.* - 1985. – **81**, N 1. – P. 137–141.

Цитированная литература

- Ota A.Y., Landry M.R. Nucleic acids as growth rate indicators for early developmental stages of *Calanus pacificus* Brodsky // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1984. – N 80. – P. 147–160.
- Oubella R., Maes P., Paillard C., Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussates* (Mollusca, Bivalvia) // Dis. Aquat. Org. – 1993. – 15, N 3. – P. 193–197.
- Owen T.G., Hochachka P.W. Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals // Biochem. J. – 1974. – 143. – P. 541–553.
- Palozza P. Evidence for pro-oxidant effects of carotenoids in vitro and in vivo // Carotenoids in Health and Disease. – New York : Marcel Dekker, 2004. – P. 127–149.
- Panepucci L., Fernandes M.N., Sanches J.R., Rantin F.T. Changes in lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, *Rhinelepis strigosa* (Siluriformes, Loricariidae) // Rev. Bras. Biol. – 2000. – 60, N 2. – P. 353–360.
- Partali V., Olsen Y., Foss P., Liaen-Jensen S. Carotenoids in food chain studies – I. Zooplankton (*Daphnia Magna*) response to a unialgal (*Scenedesmus Acutus*) carotenoid diet, to spinach, and to yeast diets supplemented with individual carotenoids // Comp. Biochem. Physiol Part B: Comp. Biochem. – 1985. – 82, N 4. – P. 767–772.
- Partali V., Tangen K., Liaen-Jensen S. Carotenoids in food chain studies – III. Resorption and metabolic transformation of carotenoids in *Mytilus edulis* (Edible mussel) // Comp. Biochem. Physiol Part B: Comp. Biochem. – 1989. – 92, N 2. – P. 239–246.
- Pavlović S.Z., Slavica S., Borković M., Radovanović T.B., Perendija B.R., Despotović S.G., Gavrić J.P., Seasonal variations of the activity of antioxidant defense // Mar. Drugs. – 2010. – 8. – P. 413–428.
- Paynter K.T., Ellis L.L., Bishop S.H. Cellular location and partial characterization of the alanine aminotransferase in ribbed mussel gill tissue // J. Exper. Zool. – 1984b. – 232, N 1. – P. 51–58.
- Paynter K.T., Hoffmann R.J., Ellis L.L., Bishop S.H. Partial characterization of the cytosolic and mitochondrial aspartate aminotransferase from ribbed mussel gill tissue // J. Exper. Zool. – 1984a. – 231 – P. 185–197.
- Paynter K.T., Karam G.A., Ellis L.L., Bishop S.H. Subcellular distribution of aminotransferases, and pyruvate branch point enzymes in gill tissue from four bivalves // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. – 1985. – 82, N 1. – P. 129–132.
- Pease A.K. The use of estimates of ribonucleic acid to predict the growth rates of zooplankton organisms // Thesis Univ. of British Columbia. – 1988. – Vancouver, British. C. – P. 104–109.
- Pellerin-Massicotte J. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves // J. Aquat. Ecosyst. Health. – 1994. – 3, N 2. – P. 101–111.
- Pellerin-Massicotte J., Araujo M. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive gland of blue mussel (*Mytilus edulis*) // J. Rech. Oceanogr. – 1997. – 22, N 3. – P. 91–98.

Цитированная литература

- Pelletier D., Blier P.U., Dutil J.D.* How should enzyme activities be used in fish growth studies // *J. Exp. Biol.* – 1995. – **198**. – P. 1493–1497.
- Pena-Llopis S., Ferrando M.D., Pena J.B.* Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves // *Chemosphere.* – 2002. – **47**, N 5. – P. 485–497.
- Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H.* Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health // *Mar. Drugs.* – 2011. – **9**, N 10. – P. 1806–1828.
- Pennec M.* Les methodes experimentales induisant la ponte chez les mollusques bivalves marins // *Haliotis.* – 1981. – **11**. – P. 139–155.
- Perry S.F., Montpetit C.J., Julio A.E., Moore K.* The influence of chronic anaemia on catecholamine secretion in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *J. Comp. Physiol.* – 1999. – **169**, N 4/5. – P. 335–343.
- Perry S.F., Reid S.G.* The effects of acclimation temperature on the dynamics of catecholamine release during acute hypoxia in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // *J. Exp. Biol.* – 1994. – **186**. – P. 289–307.
- Petes L.E.* Effects of environmental stress on intertidal mussel reproduction : PhD Thesis / The Oregon State University. – Convallis, 2007. – 174 p.
- Piro M.C., Gambacurta A., Ascoli F.* *Scapharca inaequivalvis* tetrameric hemoglobin A and B chains: cDNA sequencing and genomic organization // *J. Molecular Evol.* – 1996. – **43**, N 6. – P. 594–601.
- Polle J.E.W., Lee H.-K., Hyun S.-M., Chang M., Jin E.-S.* Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application // *Journal of Microbiology and Biotechnology.* – 2003. – **13**, N 2. – P. 165–175.
- Porte C., Biosca X., Sole M., Albaiges J.* The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain) // *Mar. Environ. Poll.* – 2001. – **112**. – P. 261–268.
- Porte C., Escartin E., Garcia de la Parra L.M., Biosca X., Albaiges J.* Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus* // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 2002. – **235**. – P. 205–216.
- Porte C., Sole M., Albaiges J., Livingstone D.R.* Responses of the mixed-functions oxygenase and antioxidant system of *Mytilus sp.* to organic pollution // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1991. – **100C**, N 1–2. – P. 183–186.
- Porte C., Sole M., Borghi V., Martinez M., Chamorro J., Torreblanca A., Ortiz M., Orbea A., Soto M., Cajaraville M.P.* Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Spanish mediterranean coast // *Biomarkers.* – 2001. – **6**. – P. 335–350.
- Power A., Sheehan D.* Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis* // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1996. – **114C**. – P. 99–103.
- Pulz O., Gross W.* Valuable products from biotechnology of microalgae // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – **65**, N 6. – P. 635–648.
- Puppo J., Blasco J.* Partial characterization of alanine aminotransferase from gills and digestive gland of the bivalve *Ruditapes philippinarum* // *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* – 1995. – **1**, N 1. – P. 99–109.

Цитированная литература

- Qian Y., Chen H., Sun J.* Effects of starvation on the hematological and blood biochemical indices in cultured *Lateolabrax japonicus* // J. Fish. Sci. China. – 2002. – **9**, N 2. – P. 133–137.
- Qin X., Waite J.H.* A potential mediator of collagenous block copolymer gradients in mussel byssal threads // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – **95**, N 18. – P. 10517–10522.
- Ramos-Martinez J.I., Bartolome T.R., Pernas R.V.* Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of *Mytilus edulis* L. // Comp. Biochem. Physiol. – 1983. – **75B**. – P. 689–692.
- Ramp W.K., Arnold R.R., Russell J.E., Yancey J.M.* Hydrogen peroxide inhibits glucose metabolism and collagen synthesis in bone // J. Periodontol. – 1987. – **58**, N 5. – P. 340–344.
- Ratcliff N.A., Rowley A.F.* A comparative synopsis of the structure and function of the blood cells of insects and other invertebrates // Develop. Comp. Immunol. – 1979. – **3**, N 2. – P. 189–221.
- Rees B.B., Bowman J.A.L., Schulte P.M.* Structure and sequence conservation of a putative hypoxia response element in the lactate dehydrogenase-B gene of *Fundulus* // Biol. Bull. – 2001. – **200**. – P. 247–251.
- Rees B.B., Bowman J.A.L., Schulte P.M.* Structure and sequence conservation of a putative hypoxia response element in the lactate dehydrogenase-B gene of *Fundulus* // Biol. Bull. – 2001. – **200**. – P. 247–251.
- Regoli F.* Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* // Arch. Environ. Toxicol. – 1998. – **34**, N 1. – P. 48–63.
- Regoli F., Orlando E.* Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment // Mar. Pollut. Bull. – 1994. – **28**. – P. 592–600.
- Regoli F., Principato G.* Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // Aquat. Toxicol. – 1995. – **31**, N 2. – P. 143–164.
- Repetta D.J., Bjornland T.* Preparation of carotenoid standards // Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods / Eds.: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Bjørnland T. – Paris, 1997. – P. 239–260.
- Revkov N.K., Boltacheva N.A., Nikolaenko T.V., Kolesnikova E.A.* The soft bottom zoobenthos diversity along the Crimean coastal zone of the Black Sea // Oceanol. – 2002. – **42**, N 4. – P. 561–571.
- Ribera D., Narbonne J.F., Daubeze M., Michel X.* Characterization, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels // Mar. Environ. Res. – 1989. – **28**. – P. 279–283.
- Ribera D., Narbonne J.F., Michel X., Livingstone D.R., O'Hara S.* Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure // Comp. Biochem. Physiol. – 1991. – **100C**, N 1–2. – P. 177–181.
- Rico-Villa B., Le Coz J.R., Mingant C., Robert R.* Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) // Aquaculture. – 2006. – **256**, N 1–4. – P. 377–388.

Цитированная литература

- Rinaldi E. Alcuni dati significativi sulla proliferazione di *Scapharca inaequalis* (Bruguierre, 1789) in Adriatico lungo la costa Romagnola // Bollettino Malacologico. – 1985. – **21**, N 1–4. – P. 41–42.
- Ringwood A.H., Hameedi M.J., Lee R.F., Brower M., Peters E.C., Scott G.I., Luoma S.N., Di Giulio R.T. // Biomarkers. 1999. – **4**, N 6. – P. 391–399.
- Robertson A., Lawenctein G.G. Distribution of chlorinated organic contaminants in dreissenid mussels along the southern shores of the Great Lakes // J. Great Lakes Res. – 1998. – **24**, N 3. – P. 608–619.
- Robinson S.M.C., Ware D.M. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA:DNA ratios in the Stait of Georgia, British Columbia // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1988. – **45**, N 8. – P. 1422–1429.
- Rodrigues-Ortega M.J., Alhama J., Funes V., Romero-Ruiz A., Rodrigues-Ariza A., Lopez-Barea J. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea Gallina* from south-spanish littoral // Environ. Toxicol. Chem. – 2002. – **21**, N3. – P. 542–549.
- Romeo M., Hoarau P., Garello G., Gnassia-Barelli M., Girard J.P. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean // Environ. Pollut. – 2003. – **122**, N 3. – P. 369–378.
- Rooker J.R., Holt G.J. Application of RNA/DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) // Mar. Freshwat. Res. – 1996. – **47**, N 2. – P.12–18.
- Rosen M.J., Li F., Morall S.W., Versteeg D.J. The relationship between the interfacial properties of surfactants and their toxicity to aquatic organisms // Environ. Sci. Technol. – 2001. – **35**, N 5. – P. 954–959.
- Royer W.E.Jr., Pardanani A., Gibson Q.H., Peterson E.S., Friedman J.M. Ordered water molecules as key allosteric mediators in a cooperative dimeric hemoglobin // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – **93**, N 25. – P. 14526–14531.
- Sahin C., Duzgunes E., Okumus I. Seasonal Variations in Condition Index and Gonadal Development of the Introduced Blood Cockle *Anadara inaequalis* (Bruguierre, 1789) in the Southeastern Black Sea Coast // Turkish J. Fisher. Aquat. Sci. – 2006. – **6**. – P. 155–163.
- Sahin C., Emiral H., Okumus I. The benthic exotic species of the Black Sea: Blood Cockle (*Anadara inaequalis* Bruguierre, 1789: Mollusc) and Rapa Whelk (*Rapana thomasiana*, Crosse, 1861: Mollusc) // J. Animal Veter. Adv. – 2009. – **8**, N 2. – P. 240–245.
- Sanford K.J., Meyer D.J., Mathison M.J., Figueras J. Selective inactivation of lactate dehydrogenase isoenzymes with ionic surfactants // Biochem. – 1981. – **20**, N 11. – P. 3207–3214.
- Schagerl M., Picher C., Donabaum K. Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 2. Dinophyta, Euglenophyta, Chlorophyceae and Charales // Annales de Limnologie – Intern. J. Limnol. – 2003. – **39**, N 1. – P. 49–62.
- Scheffer M., Bascompte J., Brock W.A. Early-warning signals for critical transitions // Nature. – 2009. – V. 461. – P. 53–59.
- Shadrin N.V., Machkevsky V.K., Lezhnev I.V. Quantified phenotypic responses of mussels to eutrophication / Quantified Phenotypic Responses in Morphology and Physiology. (Aldrich, J.C., ed.). – 1993. JAPAGA, Ashford. – P. 259–270.

Цитированная литература

- Shadrin N.V., Mironov S.S., Ferat T.A.* Interrelations Between the Losses of Sandy Beaches and Biodiversity in Seas: Case of the Bakalskaya Spit (Crimea, Ukraine, Black sea) // Turkish J. Fisher. Aquat. Sci. – 2012. – **12**. – 411–415.
- Shadrin N.V., Machkevsky V.K., Lezhnev I.V.* Quantified phenotypic responses of mussels to eutrophication // Quantified Phenotypic Responses in Morphology and Physiology: Proc. of 27th European Marine Biology Symposium (Dublin, Ireland, 7-11th Sept., 1992). – Ashford, 1993. – P. 259–270.
- Shahidi F., Brown J.A.* Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 1998. – **38**, N 1. – P. 1–67.
- Shapiro A.Z.* On the Content of Macroergic Compounds in Mussel Tissues under Normal and Hypoxic Conditions // J. Biol. Mar. – 1981. – N 2. – P. 69–75.
- Sheehan D., Mcintosh J., Power A., Fitzpatrick P.J.* Drug metabolizing enzymes of mussels as bioindicators of chemical pollution // Biochem. Soc. Transact. – 1995. – **23**, N 2. – P. 419–422.
- Sheehan D., Power A.* Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defense mechanisms of bivalve mollusks // Comp. Biochem. Physiol. – 1999. – **123C**. – P. 193–199.
- Shikata T., Shimeno S.* Effects of feed restriction and starvation on fatty acid synthesis and oxidation of glucose and alanine in carp hepatopancreas // Fish. Sci. Tokyo. – 1997. – **63**, N 2. – P. 301–303.
- Shimidzu N., Goto M., Miki W.* Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms // Fisher. Sci. – 1996. – **62**, N 1. – P. 134–137.
- Shoemaker C.A., Klesius P.H., Lim C., Yildirim M.* Feed deprivation of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), influences organosomatic indices, chemical composition and susceptibility to *Flavobacterium columnare* // J. Fish Dis. – 2003. – **26**, N 9. – P. 553–561.
- Shulman G.E., Chesalin M.V., Abolmasova G.I., Yuneva T.V., Kideys A.* Metabolic strategy in pelagic squid of genus *Sthenoteuthis* (*Ommastrephidae*) as the basis of high abundance and productivity: an overview of the soviet investigations // Bull. Mar. Sci. – 2002. – **71**, N 2. – P. 815–836.
- Shulman G.E., Love R.M.* The Biochemical Ecology and Marine Fishes // Adv. Mar. Biol. – London: Academic press. – 1999. – **36**. – 347 p.
- Siddall M.E., Measures L.N., Dessler S.S.* Seasonal changes in erythrocyte osmotic fragility and haematocrit in American plaice infected with *Haemohormidium terranova* // J. Fish Biol. – 1995. – **47**, N 1. – P. 1–6.
- Siegel I.A., Gordon H.P.* Effects of surfactants on the permeability of canine oral mucosa in vitro // Toxicol. Lett. – 1985a. – **26**, N 2–3. – P. 153–158.
- Siegel I.A., Gordon H.P.* Surfactant-induced increases of permeability of rat oral mucosa to non-electrolytes in vivo // Arch. Oral. Biol. – 1985b. – **30**, N1. – P. 43–47.
- Siegel I.A., Gordon H.P.* Surfactant-induced alterations of permeability of rabbit oral mucosa in vitro // Exp. Mol. Pathol. – 1986 – **44**, N 2. – P. 132–137.
- Skorkowski E.F.* Mitochondrial malic enzyme from crustacean and fish muscle // Comp. Biochem. Physiol. – 1988. – **90 B**. – P. 19–24.
- Sliwka H.R., Partali V.* Key to Xenobiotic Carotenoids // J. Molecules. – 2012. – **17**. – P. 2877–2928.
- Soitamo A.J., Rabergh C.M.I., Gassmann M., Sistonen L., Nikinmaa M.* Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1) from Rainbow Trout: Accumulation of

Цитированная литература

- protein occurs at normal venous oxygen tension // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 23. – P. 19699–19705.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Golovina I.V.* Antioxidant enzyme complex of tissues of the Bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: a review // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2007. – **43**, N 5. – P. 556–562.
- Sole M., Porte C., Albaiges J.* Seasonal variation in the mixed-function oxidase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1995. – **14**, N 11. – P. 157–164.
- Sole M., Porte C., Biosca X., Mitchelmore C.L., Chipman J.K., Livingstone D.R., Albaiges J.* Effects of the «Aegean Sea» oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in the digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.) // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1996. – **113C**, N 2. – P. 257–265.
- Soundarapandian P., Kannupandi T., Samuel M.J.* Effect of starvation on biochemical composition of freshwater prawn juveniles of *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) // *Indian J. Exp. Biol.* – 1997. – **35**, N 5. – P. 502–505.
- Stein X., Percic P., Gnassia-Barelli M., Romeo M., Lafaurie M.* Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea // *Environ. Pollut.* – 1998. – **99**, N3. – P. 339–345.
- Stillman H., Dahlhoff E.P., Somero G.N.* Biochemical indicators of physiological state in the intertidal mussel *Mytilus californianus* // *The Physiologist.* – 1996. – **37**. – P. 921.
- Ston J., Kosakowska A.* Qualitative and quantitative analysis of Baltic phytoplankton pigments // *Oceanologia.* – 2000. – **42**, N 4. – P. 449–471.
- Storey J.M., Storey K.B.* Cell and Molecular Response to Stress // *Environmental Stressors and Gene Responses* – Elsevier Science, 2000. – **1**. – 320 p.
- Storey K.B.* Suspended animation: the molecular basis of metabolic depression // *Can. J. Zool.* – 1988. – **66**. – P. 124–131.
- Sukhotin A.A., Abele D., Portner H.O.* Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 2002. – **226**. – P. 223–234.
- Sutcliffe W.H.Jr.* Relationship between growth rate and ribonucleic acid concentration in some invertebrates // *J. Fish. Res. Bd. Can.* – 1970. – N 27. – P. 606–609.
- Suteau P., Daubeze M., Migaud M.L., Narbonne J.F.* PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 1988. – **46**, N 1-3. – P. 45–49.
- Szpak P.* Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis // *J. Archaeol. Sci.* – 2011. – **38**, N 12. – P. 3358–3372.
- Tandavanitj S., Vongpanich S., Svend Steinfeld V.* Moving behaviour of the blood cockles *Anadara granosa* and *A. nodifera* // *Proceedings of the seventh Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme (TMMP) on Central and West Java, Indonesia conducted at IPB, UNDIP, LIPI, 11-22 November 1996.* – 1997. – Part 1. **17**, N 1. – P. 237–239.
- Terwilliger R.C., Terwilliger N.B.* Thermal vent clam (*Calyptogena magnifica*) hemoglobin // *Science.* – 1983. – **219**. – P. 981–983.
- Tewari A., Joshi H.V., Raghunathan C., Sravan Kumar V. G., Khambhaty Y.* Effect of heavy metal pollution on growth, carotenoid content and bacterial flora in the gut

Цитированная литература

- of *Perna viridis* (L.) in situ condition // *Current Sci.* – 2001. – **81**, N 7. – P. 819–828.
- Tode C., Yamano Y., Ito M. First total synthesis of crassostreaxanthin B // *J. Chem. Soc. Perkin Translat. 1.* – 1999. – P. 1625–1626.
- Trevelyan G. A. Light-induced shell pigmentation in post-larval *Mytilus edulis* and its use as a biological tag // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 1987. – **39**, N 2. – P. 137–144.
- Tsushima M., Maoka T., Katsuyama M., Kozuka M., Matsuno T., Tokuda H., Nishino H., Iwashima A. Inhibitory effect of natural carotenoids on Epstein-barr virus activation activity of a Tumor promoter in Raji cells. A screening study for anti-tumor promoters // *Biol. Pharm. Bull.* – 1995. – **18**, N 2. – P. 227–233.
- Tsushima M., Maoka T., Matsuno T. Structure of carotenoids with 5,6-dihydro β -end groups from the spindle shell *Fusinus perplexus* // *J. Nat. Prod.* – 2001. – **64**, N 9. – P. 1139–1142.
- Vaquero-Sunyer R., Duarte C.M. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity.– *PNAS.* – 2008. – **105**, N 40. – P. 15452–15457.
- Vershinin A. Biological functions of carotenoids – diversity and evolution // *Biofactors.* – 1999. – **10**. – P. 99–104.
- Viarengo A., Canesi L., Garcia-Martinez P., Peters L.D., Livingstone D.R. Pro-oxidant processes and antioxidant defence system in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared to the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*) // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1995. – **111 B**, N 1. – P. 119–126.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Livingstone D.R. Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1991. – **100 C**. – P. 187–190.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M.N., Orunesu M. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1990. – **97 C**. – P. 37–42.
- Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Accomando R., Mancinelli G., Orunesu M. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions // *Mar. Environ. Res.* – 1989. – **28**. – P. 291–295.
- Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Biasi F., Cecchini G., Orunesu M. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues // *Mar. Environ. Res.* – 1988. – **24**, N 1–4. – P. 354.
- Vidal M.-L., Basseres A., Narbonne J-F. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Muller) // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2002a. – **131 C**. – P. 133–151.
- Vidal M.L., Basseres A., Narbonne J-F. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller) // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2002b. – **132**, N 1. – P. 93–104.
- Vijayaraghavan S., Rao J.V.R. Starvational stress effects on tissue lactate and lactate dehydrogenase activity in *Anabas scandens* (Cuvier) // *Comp. Physiol. Ecol.* – 1986. – **11**, N 4. – P. 233–236.
- Vincenzini M.T., Favilli F., Stio M., Vanni P., Treves C. Detergents as selective inhibitors and inactivators of enzymes // *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* – 1985. – **17**, N 3. – P. 279–295.

Цитированная литература

- Vismann B. Hematin and sulfide removal in hemolymph of the hemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequivalvis*. // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1993. – **98**. – P. 115–122.
- Vlahogianni H., Valavanidis A. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in mussels *Mytilus galloprovincialis* // Chem. Ecol. – 2007. – **23**, N 5. – P. 361–371.
- Vleugel M.M., Bos R., Buerger H., Van Der Groep P., Saramäki O.R., Visakorpi T., Van Der Wall E., Van Diest P.J. No amplifications of hypoxia-inducible factor-1alpha gene in invasive breast cancer: a tissue microarray study // Cell. Oncol. – 2004. – **26**, N 5–6. – P. 347–351.
- Waarde A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // Comp. Biochem. Physiol. – 1988. – **91 B**, N 2. – P. 207–228.
- Waite J.H., Tanzer M.L. Polyphenolic substances of *Mytilus edulis* // Science. – 1981. – **212**. – P. 1038–1040.
- Walker B., Holling C. S., Carp S.R. Resilience, adaptability and transformability in social-ecological systems // Ecol. Soc. – 2004. – **9**(2): 5. [online] URL: <http://www.ecologyandsociety.org/vol9/iss2/art5>
- Walsh M. R., De Long J.P., Hanley T.C., Post D.M. A cascade of evolutionary change alters consumer-resource dynamics and ecosystem function// Proc. R. Soc. B. - published online 23 May 2012. doi: 10.1098/rspb.2012.0496.
- Washburn P.C., Di Giulio R.T. Nitroaromatic stimulation of superoxide production in three species of freshwater fish // Mar. Environ. Res. – 1988. – **24**, N 1–4. – P. 291–294.
- Watanabe T., Shibata K., Kera Y., Takahashi S., Yamada R. Effects of hypoxic and osmotic stress on the free D-aspartate level in the muscle of blood shell *Scapharca broughtonii* // Amino Acids. – 2005. – **28**, N 3. – P. 291–296.
- Wennersten L., Forsman A. Population-level consequences of polymorphism, plasticity and randomized phenotype switching: a review of predictions // Biol. Rev. (2012), pp. 000–000. doi: 10.1111/j.1469-185X.2012.00231.x
- Wenning R.J., Di Giulio R.T. Microsomal enzyme activities, superoxide production and antioxidant defenses in ribbed mussels (*Geukensia demissa*) and wedge clams (*Rangia cuneata*) // Comp. Biochem. Physiol. – 1988a. – **90C**. – P. 21–28.
- Wenning R.J., Di Giulio R.T. The effect of paraquat on microsomal oxygen reduction and antioxidant defenses in ribbed mussels (*Geukensia demissa*) and wedge clams (*Rangia cuneata*) // Mar. Environ. Res. – 1988b. – **24**, N 1–4. – P. 301–305.
- Wenning R.J., Di Giulio R.T., Gallagher E.P. Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa* // Aquat. Toxicol. – 1988. – **12**. – P. 157–170.
- Wickramasinghe S. N. Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri* // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – **104A**. – P. 63–65.
- Wijsman T.C.M. Adenosine phosphates and energy charge in different tissues of *Mytilus edulis* under aerobic and anaerobic conditions // J. Comp. Physiol. – 1976. – **107**, N 1. – P. 129–140.
- Winston G.W., Di Giulio R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // Aquat. Toxicol. – 1991. – **19**. – P. 137–161.

Цитированная литература

- Winston G.W., Livingstone D.R., Lips F. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L. // J. Exp. Zool. – 1990. – **255**. – P. 296–308.
- Wofford H.W., Thomas P. Effect of xenobiotics on peroxidation of hepatic microsomal lipids from striped mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) // Mar. Environ. Res. – 1988. – **24**, N 1–4. – P. 285–289.
- Wojtczak L., Nałecz M.J. Surface charge of biological membranes as a possible regulator of membrane-bound enzymes // Europ. J. Biochem. – 1979. – **94**, N 1. – P. 99–107.
- 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 // J. Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – **1336**, N 3. – P. 575–586.
- Wright D.A., Martin F.D. The effect of starvation on RNA:DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis* // J. Fish. Biol. – 1985. – **27**. – P. 479–485.
- Wu R.S.S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses // Mar. Poll. Bull. – 2002. – **45**, N 1. – P. 35–45.
- Wu Y.Q., Wang C.G., Wang Y. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene, tributyltin and their mixture in the spleen of *Sebasticus marmoratus* // J. Environ. Sci. 2007. – **19**, N 9. – P. 1129–1135.
- Yang T.H., Somero G.N. Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration, and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallow- (*Scorpaena guttata*) and deep- (*Sebastes alascanus*) living Scorpaenid fishes // J. Exp. Biol. – 1993. – **181**. – P. 213–223.
- Yankson K. Gonad maturation and sexuality in the West African bloody cockle, *Anadara senilis* (L.) // J. Molluscan Stud. – 1982. – **48**. – P. 294–300.
- Yeum K.-J., Aldini G., Russell R.M., Krinsky N.I. Antioxidant/Pro-oxidant Actions of Carotenoids // Carotenoids: Nutrition and Health / Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – Basel : Birkhauser Verlag, 2009. – Chapter 12. – P. 235–262.
- Ying G.G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment // Environ. Int. – 2006. – **32**, N 3. – P. 417–431.
- Zolotarev V. Influences of organisms on their environment. The role of episodic events // Mar. Ecol. – 1996. – **17**, N 1-3. – P. 227–236.
- Zurburg W., De Zwaan A. The role of amino acids in anaerobiosis and osmoregulation in bivalves // J. Exper. Zool. – 1981. – **215**. – P. 315–325.
- Zwaan A., Babarro J.M.F., Monari M., Cattani O. Anoxic survival potential of bivalves: (arte)facts // Comp. Biochem. Physiol., A. – 2002. – **131**, N 3. – P. 615–624.
- Zwaan A., Cortesi P., van den Thillart G., Brooks S., Storey K.B., Roos J., van Lieshout G., Cattani O., Vitali G. Energy metabolism of bivalves at reduced oxygen tensions // Marine coastal eutrophication. Amsterdami: Elsevier, 1992. – N Suppl. – P. 1029–1040.
- Zwaan A., Cortesi P., van den Thillart G., Storey K.B. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: A biochemical analysis // Mar. Biol. – 1991. – **111**, N 3. – P. 343–351.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ (Солдатов А.А.).....	3
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
Глава 1. МОЛЛЮСКИ В МЕНЯЮЩЕЙСЯ ЭКОСИСТЕМЕ ЧЕРНОГО МОРЯ (Шадрин Н.В.)...	9
1.1. Разнообразие и роль моллюсков в Черном море	9
1.2. Современные взгляды на динамику биологических/экологических систем	15
1.3. Изменения структуры таксоценоза моллюсков: причины и последствия	17
Глава 2. АНТИОКСИДАНТНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС ТКАНЕЙ ЧЕРНОМОРСКИХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ (Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В.).....	22
2.1. Сравнительная характеристика АО комплекса и процессов ПОЛ у моллюсков и других организмов	22
2.1.1. Процессы ПОЛ.....	22
2.1.2. АО ферментный комплекс.....	24
2.2. АО ферментный комплекс тканей <i>M. galloprovincialis</i>	25
2.2.1. Черная морфа.....	27
2.2.2. Коричневая морфа.....	30
2.2.3. Моллюски с депигментированными тканями.....	31
2.2.4. Возможные причины, определяющие тканевую специфику АО ферментного комплекса мидий.....	32
2.2.5. Цветовой полиморфизм раковины и АО ферментный комплекс тканей мидий.....	240
2.3. Система АО защиты тканей мидий в условиях естественного окислительного стресса	43
2.3.1. Влияние естественных состояний на систему АО защиты и процессы ПОЛ у моллюсков.....	43
2.3.2. Интенсивность процессов ПОЛ в тканях мидий в условиях нереста...	46

2.3.3. Состояние АО ферментной системы тканей мидии в условиях нереста.....	48
2.3.4. Вероятные пути влияния состояния нереста на АО ферментный комплекс тканей мидий.....	52
2.4. Система АО защиты тканей мидий в условиях экспериментальной окислительной нагрузки.....	58
2.4.1. Токсические и биологические эффекты детергентов на биообъекты....	59
2.4.2. Влияние ТДТМА на процессы ПОЛ и АО статус тканей мидии.....	61
2.4.3. Вероятные механизмы токсического действия катионных детергентов на организм гидробионтов.....	67
2.4.4. Состояние АО ферментного комплекса тканей мидий при действии ТДТМА.....	69
2.5. Функциональные состояния АО ферментного комплекса тканей <i>M. galloprovincialis</i>.....	71
2.5.1. Глутатионовая система.....	71
2.5.2. Каталаза и супероксиддисмутаза.....	74
2.6. АО ферментный комплекс тканей <i>M. galloprovincialis</i> в биомониторинге морской среды.....	76
2.7. АО комплекс двустворчатого моллюска <i>Anadara inaequalvis</i> Br. (Гостюхина О.Л., Головина И.В.).....	78
2.7.1. Тканевые особенности АО комплекса <i>A. inaequalvis</i>	78
2.7.2. Сравнительный анализ состояния АО комплекса тканей мидии <i>M. galloprovincialis</i> , анадары <i>A. inaequalvis</i> и устрицы <i>C. gigas</i>	82
Глава 3. КАРОТИНОИДЫ ТКАНЕЙ МАССОВЫХ ВИДОВ ЧЕРНОМОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ (Бородина А.В., Солдатов А.А.).....	87
3.1. Каротиноиды морского происхождения.....	88
3.1.1. Исследования каротиноидов (общие положения).....	88
3.1.2. Каротиноиды морского происхождения.....	90
3.1.3. Содержание и качественный состав каротиноидов фитопланктонного сообщества Черного моря.....	92
3.1.4. Содержание и качественный состав каротиноидов тканей черноморских моллюсков-фильтраторов.....	97
3.1.5. Содержание и качественный состав каротиноидов тканей хищных видов моллюсков.....	103
3.1.6. Пути трансформации каротиноидов в трофической цепи «моллюск-фильтратор → хищник (морская звезда)».....	105
3.2. Сравнительная оценка состава и содержания	107

каротиноидов в тканях моллюсков-фильтраторов	
3.2.1. Содержание и состав каротиноидов <i>M. galloprovincialis</i>	107
3.2.2. Содержание и состав каротиноидов <i>C. gigas</i>	114
3.2.3. Содержание и состав каротиноидов <i>A. inaequalvis</i>	121
3.2.4. Каротиноиды тканей моллюсков-фильтраторов (сравнительная характеристика).....	127
3.3. Каротиноиды тканей различных цветовых морф <i>M. galloprovincialis</i>	137
3.3.1. Содержание каротиноидов в тканях трех цветовых морф мидий.....	137
3.3.2. Качественный состав каротиноидов тканей трех цветовых морф мидий.....	138
3.4. Сезонная динамика содержания и состава каротиноидов в тканях <i>A. inaequalvis</i>	142
3.4.1. Содержание и состав каротиноидов тканей <i>A. inaequalvis</i>	142
3.4.2. Оценка корреляционных связей.....	148
3.5. Каротиноиды тканей брюхоногого моллюска <i>Rapana venosa</i> Val.	153
3.5.1. Содержание и состав каротиноидов тканей <i>R. venosa</i>	153
3.5.2. Состав и содержание каротиноидов в гонадах <i>R. venosa</i> в период нереста.....	158
3.5.3. Вероятные пути трансформации каротиноидов в трофической цепи «моллюск-фильтратор→моллюск-хищник».....	164
Глава 4. СПЕЦИФИКА ТКАНЕВОГО МЕТАБОЛИЗМА У ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА <i>ANADARA INAEQUALVIS</i> (BRUGUIERE, 1789) (Андреенко Т.И., Солдатов А.А., Головина И.В.).....	169
4.1. Особенности биологии и физиологии <i>A. inaequalvis</i> (Андреенко Т.И., Солдатов А.А.).....	169
4.1.1. Внешнее строение <i>A. inaequalvis</i>	170
4.1.2. Условия обитания.....	170
4.1.3. Размножение.....	171
4.1.4. Особенности физиологии.....	171
4.1.5. Специфика тканевого метаболизма.....	173
4.2. Сравнительная оценка тканевого метаболизма у <i>A. inaequalvis</i> и <i>M. galloprovincialis</i> при нормоксии	174
4.2.1. Непрямая калориметрия (Столбов А.Я.).....	174

4.2.2. Характеристики углеводного обмена.....	174
4.2.3. Характеристики белкового обмена.....	177
4.3. Пути реорганизации тканевого метаболизма у <i>A. inaequivalvis</i> в условиях экспериментальной аноксии.....	182
4.3.1. Моделирование внешней гипоксии.....	182
4.3.2. Поведенческие реакции.....	184
4.3.3. Особенности углеводного метаболизма.....	184
4.3.4. Особенности белкового метаболизма.....	186
4.3.5. Аденилатная система (тканевая специфика) (Солдатов А.А., Сысоева И.В., Сысоев А.А.).....	191
4.3.6. Аденилатная система (адаптация к аноксии).....	192
4.4. Пути реорганизации тканевого метаболизма у <i>A. inaequivalvis</i> при голодании.....	199
4.4.1. Особенности углеводного метаболизма.....	199
4.4.2. Особенности белкового метаболизма.....	201
4.5. Особенности организации тканевого метаболизма у <i>A. inaequivalvis</i> (заключительные аспекты).....	207
4.5.1. Метаболизм в условиях нормоксии.....	207
4.5.2. Метаболизм в условиях аноксии.....	210
4.5.3. Метаболизм при голодании.....	214
<u>Глава 5. ЭРИТРОИДНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА <i>ANADARA INAEQUIVALVIS</i> (BRUGUIERE, 1789) (Новицкая В.Н.).....</u>	217
5.1. Функциональная морфология эритроцитов гемолимфы <i>A. inaequivalvis</i>.....	218
5.2. Эритроидные элементы гемолимфы <i>A. inaequivalvis</i> в условиях экспериментальной аноксии.....	222
5.2.1. Гематологические исследования.....	223
5.2.2. Осмотическая стойкость эритроцитов.....	223
5.2.3. Морфометрические характеристики эритроцитов.....	224

Глава 6. ЦВЕТОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ РАКОВИН И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> LAM. (Куликова А.Д., Андреев Т.И.).....	229
6.1. Выявление цветковых групп <i>M. galloprovincialis</i>...	229
6.1.1. Разработка метода цветовой дифференциации моллюсков.....	230
6.1.2. Идентификация цветковых групп.....	233
6.1.3. Асимметрия цветковых характеристик правой и левой створок раковины <i>M. galloprovincialis</i>	236
6.2. Активность аминотрансфераз и альдозазы в тканях мидий с различной окраской створок раковины	237
6.2.1. Активность аспаратаминотрансферазы в тканях мидии.....	238
6.2.2. Активность аланинаминотрансферазы в тканях мидии.....	240
6.2.3. Активность альдозазы в тканях мидии.....	245
Глава 7. ПРОЦЕССЫ РОСТА И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ У МАССОВЫХ ВИДОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ЧЕРНОГО МОРЯ (Щербань С.А.).....	248
7.1. Индикаторы процессов белкового синтеза и ретенции белка у представителей морских <i>Bivalvia</i>	248
7.2. Процессы синтеза белка в тканях моллюсков	252
7.2.1. Цветовой полиморфизм раковин и особенности белкового синтеза в соматических и генеративных тканях <i>M. galloprovincialis</i>	252
7.2.2. Особенности белкового синтеза в генеративной ткани у <i>M. galloprovincialis</i> на протяжении репродуктивного периода.....	254
7.2.3. Сравнительный анализ содержания нуклеиновых кислот в гонадах и половых продуктах <i>M. galloprovincialis</i> (Щербань С.А., Караванцева Н.В.).....	257
7.2.4. Особенности белкового синтеза в соматических тканях двустворчатого моллюска-вселенца <i>A. inaequalis</i>	259
7.3. Тканевая специфика белкового синтеза у двустворчатых моллюсков в условиях экспериментальной гипоксии и аноксии	262
7.3.1. Особенности белкового синтеза в соматических тканях <i>M. galloprovincialis</i> под влиянием краткосрочной гипоксии.....	262
7.3.2. Тканевые особенности белкового анаболизма у <i>A. inaequalis</i> в	264

условиях экспериментальной аноксии и голодания.....	
7.4. Тканевая специфика белкового синтеза в условиях действия токсических соединений	266
7.4.1. Влияние ПХБ на процессы соматического роста тканей <i>M. galloprovincialis</i>	266
7.4.2. Влияние катионного детергента (ТДТМА) на процессы соматического роста тканей <i>M. galloprovincialis</i>	268
ЗАКЛЮЧЕНИЕ (Солдатов А.А.).....	270
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА	274

Наукове видання

Чорноморські молюски: елементи порівняльної і екологічної біохімії /
Під ред. Г.Є. Шульмана, О.О. Солдатова; Інститут біології південних морів
НАН України. - Севастополь: ЭКОСІ-Гідрофізика, 2014. - 323 с. (138 іл., 63
табл.)

Монографія

(російською мовою)

Рецензенти: Арсан О.М., д.б.н., професор
Столяр О.Б., д.б.н., професор
Киричук Г.Е., д.б.н., професор

Друкується за постановою вченої ради
Інституту біології південних морів НАН України
(протокол № 2 від 4 лютого 2014 р.)