

УДК 594:577.127(262.5)

## ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ТКАНЯХ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ФИЛЬТРАТОРА *POLITITAPES AUREUS* (GMELIN, 1791) ИЗ ЧЁРНОГО МОРЯ

© 2022 г. А. В. Бородина<sup>1</sup> \*, П. А. Задорожный<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии южных морей РАН, Севастополь 299011, Россия

<sup>2</sup>Институт химии ДВО РАН, Владивосток 690022, Россия

\*e-mail: borodinaav@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.

После доработки 21.04.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Представлены результаты изучения состава каротиноидов в тканях морского двустворчатого моллюска-фильтратора *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791), обитающего в Чёрном море в одной из кутовых зон б. Казачья в районе г. Севастополь. В течение годового цикла динамика суммарных каротиноидов в мягких тканях моллюска была максимальной ( $1.7 \pm 0.47$  мг/100 г сырой ткани) весной в начале марта, к лету этот показатель снижался до  $0.41 \pm 0.10$  мг/100 г сырой ткани и оставался практически неизменным до конца года (менее 0.5 мг/100 г сырой ткани). Качественный состав каротиноидов был исследован в весенних и осенних пробах. Идентифицированы  $\beta$ -каротин, эхиненон, лютеин, зеаксантин, аллоксантин, фукоксантин, амароциаксантин А, гетероксантин и мактраксантин, доля которых составляла около 80% от общего количества каротиноидов. Обсуждаются качественный состав каротиноидов у моллюсков-фильтраторов, обитающих в этом экотопе вместе с *P. aureus*, и возможные пути трансформации растительных каротиноидов в тканях *P. aureus*. Проведено сравнение состава каротиноидов в тканях *P. aureus* и других двустворчатых моллюсков рода *Polititapes* из разных регионов Мирового океана.

**Ключевые слова:** каротиноиды, *Polititapes aureus*, метаболизм, амароциаксантин А

DOI: 10.31857/S0134347522050035

*Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) — морской вид двустворчатых моллюсков-фильтраторов из семейства Venegidae, обитающий в смешанных донных сообществах на илисто-песчаных грунтах (Киселева 1981; Промысловые биоресурсы..., 2011). Сведения о распространении этого моллюска в шельфовой зоне крымского побережья Черного моря в основном касаются глубоководной части (25–50 м) (Киселева, 1981; Промысловые биоресурсы..., 2011). Нами были обнаружены моллюски *P. aureus* в составе смешанного сообщества двустворчатых моллюсков *Chamelea gallina* (Bruguiere, 1789) и *Cerastoderma glaucum* (Linnaeus, 1758) на песчаном грунте в верховье б. Казачья на глубине 0–0.5 м. В это же время в данном районе проводился мониторинг состава зообентоса (Макаров, 2020).

Работы по исследованию моллюсков кутовых зон бухт (в зоне заплеска воды) немногочисленны, хотя очевидно, что условия жизни животных, обитающих в прибрежной зоне, по гидрохимическим, трофическим и кислородным условиям обитания отличаются от таковых в глубоковод-

ной части шельфовой зоны. Эти факторы влияют на участвующую в адаптации к изменяющимся внешним условиям обитания антиоксидантную систему двустворчатых моллюсков, приводя к количественному или качественному изменению состава каротиноидов (Бородина, Задорожный, 2020, 2021). Наиболее полно состав каротиноидов у двустворчатых моллюсков рода *Polititapes* (ранее *Raphia*) изучен у обитающих в тихоокеанском регионе видов *Raphia amabilis* и *P. euglypta*, у которых обнаружен амароциаксантин А — видоспецифичный каротиноид, являющийся своеобразным маркером рода *Polititapes* (Matsuno et al., 1985; Maoka et al., 2008; Маока, 2011). Каротиноид животного происхождения амароциаксантин А — продукт метаболической трансформации; в тканях моллюсков рода *Polititapes* он происходит от фукоксантина — каротиноида диатомовых и динофитовых микроводорослей (Маока, 2011). Показано, что для *P. amabilis* и *P. euglypta* характерно увеличение пути метаболизма перидинина до образования гидратоперидинина и циклопирроксантина (Matsuno et al., 1985; Маока et al., 2008;

Маака, 2011). Изменения экологии и гидрохимии Чёрного моря (Елкин и др., 2018) приводят к изменениям в организмах моллюсков, культивируемых на морских фермах (Трошенко и др., 2019) и обитающих в природных бентосных сообществах (Бородина, Солдатов, 2014; Бородина, Задорожный, 2021). Ранее были рассмотрены различия состава каротиноидов у черноморских двусторчатых моллюсков-фильтраторов и у моллюсков этих же видов или видов того же рода из других регионов Мирового океана (МО) (Бородина, Солдатов, 2014; Бородина, Задорожный, 2021). Настоящая работа является продолжением исследования сезонной годовой динамики состава каротиноидов у двусторчатых моллюсков-фильтраторов, обитающих в кутовой части бухт крымского побережья Чёрного моря (Бородина, Задорожный, 2020, 2021; Borodina, Zadorozhny, 2021). Цель работы — изучение состава каротиноидов в тканях *P. aureus*, обитающего в смешанном донном сообществе с *C. glaucum* и *Ch. galina*, а также сравнение состава каротиноидов у этих моллюсков и у представителей рода *Politiitapes* из других регионов МО.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования — двусторчатый моллюск *Politiitapes aureus* (Gmelin, 1791), обитающий в составе смешанного донного сообщества песчаной зоны верхней сублиторали (глубина 0–1 м) б. Казачья у г. Севастополь. Для определения годовой динамики содержания суммарных каротиноидов в тканях моллюска в течение 2019 и 2021 гг. один раз в месяц отбирали по 8–15 особей с длиной раковины 10–20 мм. Для изучения качественного состава каротиноидов использовали две выборки по 30 животных, взятые весной (апрель, май) и осенью (сентябрь, октябрь). Суммарное содержание каротиноидов (ССК) определяли спектрофотометрическим методом (Карнаухов, Федоров, 1982; Карнаухов, 1988). Мягкие ткани гомогенизировали в фарфоровой ступке, затем в ней же проводили экстракцию 100% ацетоном. Суммарный экстракт каротиноидов герметично упаковывали в атмосфере азота и при низкой температуре транспортировали в Институт химии ДВО РАН для идентификации методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (MS).

### *Хроматографические методы и масс-спектрометрия*

Разделение пигментов проводили методом ВЭЖХ, как описано ранее (Бородина, Задорожный, 2020, 2021). Для разделения использовали хроматограф Shimadzu LC-20 с диодно-матричным детектором SPD-M20A; колонку Zorbax Sil

4.6 × 250 мм, скорость потока 1 мл/мин, в градиенте гексан : ацетон (0–20 мин гексан : ацетон 8 : 2, изократические условия; с 20 до 25 мин линейный градиент от 20 до 80% ацетона; 25–35 мин гексан : ацетон 2 : 8, изократический режим). Фракции каротиноидов собирали после разделения (10–15 разделений), объединяли, упаривали досуха на роторном испарителе при температуре 40°C, перерастворяли в метаноле и прописывали масс-спектры с использованием масс-спектрометрического детектора низкого разрешения Shimadzu LCMS-2010EV, источник АРСІ, в режиме положительных ионов. Омыление каротиноидов проводили повторным растворением их в 5%-ном растворе КОН в метаноле.

На основе данных ВЭЖХ при 450 нм оценивали содержание отдельных каротиноидов методом нормирования площадей пиков пигментов с использованием коэффициента А 1%/1 см: для фуккоксантина — 2500, для его производных — 1600. Отношение максимумов III/II, % в спектрах поглощения рассчитывали, как описано ранее (Carotenoids..., 1994; Бородина, Задорожный, 2020, 2021). Количество каротиноидов в этерифицированном виде оценивали после щелочного гидролиза.

### *Статистический анализ*

Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводились при помощи пакета “Grapher-7”. Результаты расчета суммарных каротиноидов на графике представлены как среднее арифметическое ( $\bar{x}$ ) и стандартная ошибка средней ( $S\bar{x}$ ). Для сравнения содержания каротиноидов в мягких тканях моллюсков в течение года применяли *U*-критерий Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Большая часть тканей *Politiitapes aureus* окрашена в бледный розово-серый цвет, исключение составляют ярко-желтые гонады и темный зелено-коричневый гепатопанкреас, скрытый под ногой моллюска (рис. 1). Фотография сделана в марте, когда суммарный уровень каротиноидов максимально высок (рис. 2).

Наиболее высокое суммарное содержание каротиноидов в тканях *P. aureus* 1.68 ± 0.47 мг/100 г сырой массы отмечено в весенние месяцы с пиком в марте (рис. 2). В данный период начинается созревание гонад, которые в это время заметны при визуальном обследовании животных (рис. 1).

Качественный состав каротиноидов определяли весной и осенью. В суммарных экстрактах обеих проб методом ВЭЖХ идентифицированы следующие каротиноиды и их эфиры (рис. 3, табл. 1):



Рис. 1. Препарированный двустворчатый моллюск *Polittapes aureus* (март 2021 г.).

$\beta$ -каротин: время удерживания ( $R_t$ ) – 2.74 мин, максимумы поглощения в элюенте ( $\lambda_{\max}$ ) – 425, 448 и 474, отношение III/II, % – 15, отношение массы иона к его заряду ( $m/z$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup>) – 537;

эхиненон:  $R_t$  – 2.9 мин,  $\lambda_{\max}$  – 452, III/II, % – 0;

фракция этерифицированных каротиноидов:  $R_t$  – 2.9–3.2 мин, после омыления основной пик  $R_t$  – 30.72 мин,  $\lambda_{\max}$  – 427, 449 и 479, III/II, % – 65;

лютеин:  $R_t$  – 13.8 мин,  $\lambda_{\max}$  – 448 и 473, III/II, % – 44,  $m/z$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> – 569;

зеаксантин:  $R_t$  – 14.1 мин,  $\lambda_{\max}$  – 451 и 475, III/II, % – 5;

аллоксантин:  $R_t$  – 17.1 мин,  $\lambda_{\max}$  – 452 и 481, III/II, % – 50,  $m/z$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> – 565;

фукоксантин:  $R_t$  – 27.16 мин,  $\lambda_{\max}$  – 448 и (469), III/II, % – 0,  $m/z$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> – 659,  $m/z$  [ $M + Na$ ]<sup>+</sup> – 681, фракция неразделима со стандартом, выделенным из *Laminaria* sp.;

гетероксантин:  $R_t$  – 30.72 мин,  $\lambda_{\max}$  – 425, 448 и 477, III/II, % – 62,  $m/z$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> – 601;

амароциаксантин A:  $R_t$  – 32.27 мин,  $\lambda_{\max}$  – 440, III/II, % – 0;

мактраксантин:  $R_t$  – 33.09 мин,  $\lambda_{\max}$  – 418, 442 и 471, III/II, % – 91,  $m/z$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> – 637.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В течение года из-за смены состава фитопланктона (сезонная сукцессия) у многих видов двустворчатых моллюсков суммарный состав каротиноидов меняется (Бородина, Солдатов, 2014; Бородина, Задорожный, 2020, 2021; Borodina, Zadorozhny, 2021). Весной обильный спектр питания и благоприятная температура стимулируют репродуктивный цикл у многих видов моллюсков (Холодов и др., 2010; Черноморские моллюски...

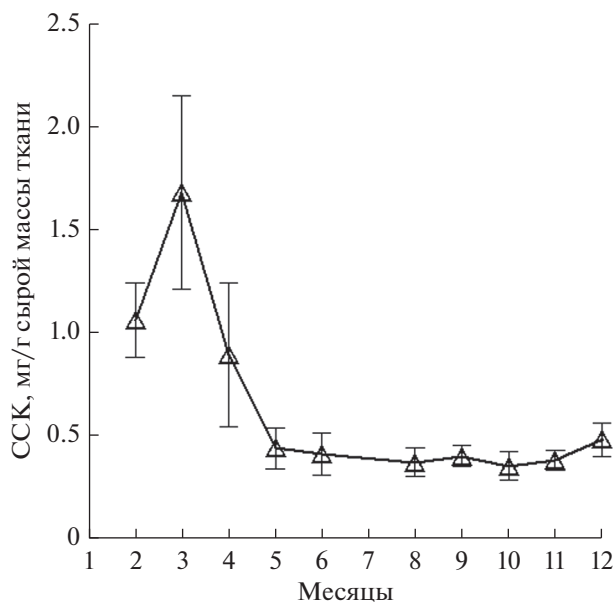


Рис. 2. Годовая динамика содержания суммарных каротиноидов в тканях двустворчатого моллюска *Polittapes aureus*. ССК – содержание суммарных каротиноидов.

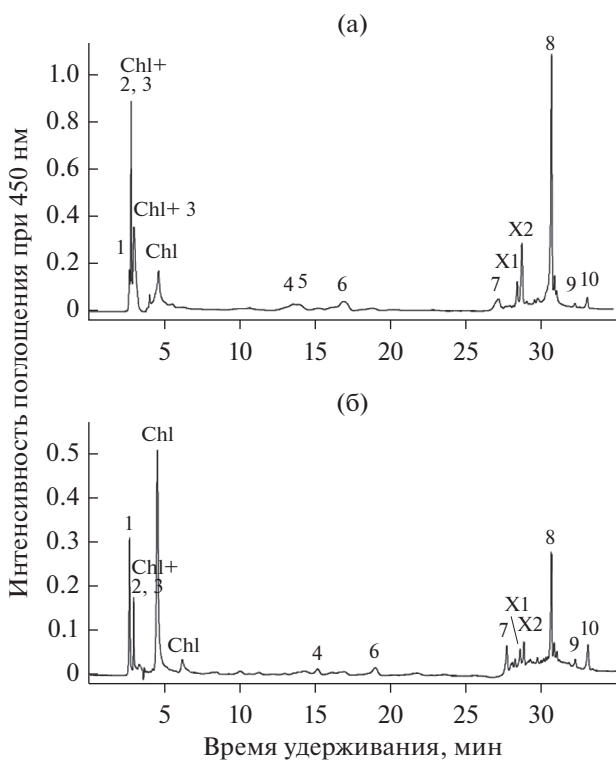


Рис. 3. Высокоэффективная жидкостная хроматография неомыленного экстракта каротиноидов мягких тканей двустворчатого моллюска *Polittapes aureus* из весенней (а) и осенней (б) выборки. Обозначения пиков: 1 –  $\beta$ -каротин, 2 – эхиненон, 3 – эфиры каротиноидов, преимущественно гетероксантина, 4 – лютеин, 5 – зеаксантин, 6 – аллоксантин, 7 – фукоксантин, 8 – гетероксантин, 9 – амароциаксантин A, 10 – мактраксантин, Chl – хорофилл и его производные, X1 и X2 – неидентифицированные каротиноиды.

**Таблица 1.** Состав и содержание каротиноидов в мягких тканях двустворчатого моллюска *Polittapes aureus*

Каротиноиды	Проба, %	
	весенняя	осенняя
Каротины	6.1	23.1
Эхиненон	0.9	0.1
Эфиры каротиноидов	5.8	2.0
Лютеин	0.7	0.9
Зеаксантин	0.1	0.2
Аллоксантин	10.2	6.7
Фукоксантин	10.9	8.5
Гетероксантин	42.4	25.8
Амароциаксантин А	1.4	2.4
Мактраксантин	2.9	8.5
Неидентифицированные	18.6	21.8

2014). В эти периоды спектр каротиноидов в тканях *Valvula* обогащается и количественно, и качественно.

Согласно полученным результатам, гетероксантин был основным каротиноидом мягких тканей *Polittapes aureus*, в значительных количествах присутствовали также аллоксантин, фукоксантин и фракция каротинов (табл. 1). Сравнение весенней и осенних выборок показало, что основные различия между ними связаны с изменениями относительного содержания фракции каротинов и гетероксантина. В весенний период содержание каротинов было минимальным, а доля гетероксантина и других ксантофиллов увеличена.

Качественный состав каротиноидов в тканях *P. aureus* был близок к таковому у обитающих в этом же биотопе *Cerastoderma glaucum* и *Chamelea galina* (Бородина, Задорожный, 2020, 2021). При одинаковых внешних экологических условиях (спектр питания, температура и т.д.) эти моллюски накапливали в мягких тканях не менее шести одинаковых каротиноидов: каротины, лютеин, диатоксантин, аллоксантин, фукоксантин и гетероксантин; в неидентифицированных фракциях было возможно наличие других общих каротиноидов. Среди этих общих для *P. aureus*, *C. glaucum* и *Ch. galina* каротиноидов можно выделить каротиноиды, ассимилирующиеся из пищи, например, лютеин, диатоксантин, фукоксантин и гетероксантин. Однако с точки зрения энергетических затрат организма для моллюсков более важны их

собственные каротиноиды, образующиеся в тканях по определенным метаболическим путям в процессе преобразований растительных каротиноидов; это фукоксантин → ... амароциаксантин А (Маока, 2011) и (виолаксантин?) → ... мактраксантин (табл. 1) (Бородина, Задорожный, 2020). Путь образования мактраксантина изучен не полностью, предполагается, что его предшественником может быть виолаксантин – каротиноид зеленых микроводорослей (Бородина, Задорожный, 2020). У *P. aureus*, в отличие от *C. glaucum* и *Ch. galina* из этого же сообщества, отмечено накопление эхиненона, низкое содержание эфиров каротиноидов, отсутствие диатоксантина и галоциантиаксантина, а также зеаксантина, обнаруженного у *C. glaucum*. Это подтверждает наличие видовых особенностей в накоплении каротиноидов в тканях разных видов моллюсков из одного местообитания.

При сравнении состава каротиноидов у *P. aureus* и у видов этого рода из других регионов Мирового океана обнаружены существенные отличия. В тканях пафий из Японского моря (Matsuno et al., 1985; Маока et al., 2008; Маока, 2011) описан наиболее сложный путь трансформации растительного перидинина: перидинин → ... → гидратпирроксантин (эфиры). Согласно нашим результатам, у черноморского *P. aureus* среди идентифицированных соединений каротиноиды этого пути отсутствуют, из общих каротиноидов в тканях *P. amabilis* и *P. euglypta* из Японского моря, а так-

же *P. aureus* из Черного моря отмечен только амароциаксантин А.

Таким образом, у двустворчатого моллюска *P. aureus*, обитающего в кутовой части б. Казачья крымского побережья Чёрного моря, наблюдается только один (весенний) максимум накопления ССК; в течение года состав каротиноидов в тканях моллюска изменяется незначительно. Качественный состав каротиноидов на 80% представлен каротином, эхиненоном, лютеином, зеаксантином, аллоксантином, фукоксантином, амаруциаксантином А, гетероксантином, мактраксантином. У моллюсков-фильтраторов *P. aureus*, *C. glaucum* и *Ch. galina* набор каротиноидов может меняться в соответствии с условиями обитания, при этом сохраняются неизменными видоспецифичные каротиноиды животного происхождения.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме № 121041400077-1 государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”. В работе использовано оборудование ЦКП “Дальневосточный центр структурных исследований” Института химии ДВО РАН.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Первый автор проводил сбор материала, определение суммарных каротиноидов и обработку полученных результатов, а также отвечал за подготовку и написание рукописи, подачу документов и ответы рецензентам. Второй автор проводил идентификацию каротиноидов методами ВЭЖХ и МС в течение всего периода исследований, а также редактировал и дополнил рукопись в области химии каротиноидов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бородина А.В., Задорожный П.А. Динамика каротиноидов в тканях моллюска-фильтратора *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) в годовом цикле // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2020. Т. 56. № 1. С. 3–12.

Бородина А.В., Задорожный П.А. Сезонная динамика каротиноидов двустворчатого моллюска *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) в Черном море // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2021. Т. 57. № 3. С. 250–256.

Бородина А.В., Солдатов А.А. Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков // Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014. С. 87–168.

Елкин Д.Н., Журбас В.М., Ижицкий А.С. и др. Гидрофизические и экологические процессы в прибрежной зоне Чёрного моря. М.: Научный мир. 2018. 414 с.

Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука. 1988. 240 с.

Карнаухов В.Н., Федоров Г.Г. Методы определения содержания каротиноидов и витамина А в клетках животных. Пушино: НЦБИ АН СССР. 1982. 28 с.

Киселева М.И. Бентос рыхлых грунтов Черного моря. Киев: Наукова думка. 1981. 409 с.

Макаров М.В. Современное состояние малакофауны рыхлых грунтов в вершинной части бухты Казачьей (Черное море) // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. 2020. № 1. С. 119–130.

Промысловые биоресурсы Чёрного и Азовского морей / Ред. В.Н. Еремеев, А.В. Гаевская, Г.Е. Шульман, Ю.А. Загородняя. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2011. 367 с.

Троценко О.А., Субботин А.А., Еремин И.Ю. Изменчивость основных лимитирующих факторов среды в процессе выращивания двустворчатых моллюсков на ферме в районе Севастополя // Уч. зап. Крымск. фед. ун-та им. В.И. Вернадского. География. Геология. 2019. Т. 5 (71). № 2. С. 308–321.

Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Выращивание мидий и устриц в Черном море. Севастополь: Ин-т биол. южных морей им. А.О. Ковалевского НАНУ. 2010. 424 с.

Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии / Ред. Г.Е. Шульман, А.А. Солдатов. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014. 323 с.

Borodina A.V., Zadorozhny P.A. Ecological features of the accumulation of carotenoids in the Black Sea mollusks // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021. V. 937. Art. 022077.

Carotenoids. V. 1B: Spectroscopy. Basel: Birkhäuser. 1994. 360 p.

Maoka T., Akimoto N., Yim M.J. et al. New C<sub>37</sub> skeletal carotenoid from the clam, *Paphia amabilis* // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 24. P. 12069–12072.

Maoka T. Carotenoids in Marine Animals // Mar. Drugs. 2011. V. 9. P. 278–293.

Matsumo T., Sakaguchi S., Ookubo M., Maoka T. Isolation and identification of amarouciaxanthin A from the bivalve *Paphia euglypta* (Sudaregai in Japanese) // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1985. V. 51. № 11. P. 1909–1985.

## Distinctive Variations in Carotenoid Accumulation in Tissues of the Bivalve Mollusk *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) from the Black Sea

A. V. Borodina<sup>a</sup> and P. A. Zadorozhny<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biology of Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

<sup>b</sup>*Institute of Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

The carotenoid composition has been analyzed in tissues of the marine filter-feeding bivalve mollusk *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791), dwelling in the top part of the Kazachya Bay near the Sevastopol City in the Black Sea. The dynamics of total carotenoids concentration in mollusk soft tissues follows a seasonal annual cycle, with maximum concentration ( $1.7 \pm 0.47$  mg/100 g of raw tissue) in the spring, at the beginning of March. This concentration declines to  $0.41 \pm 0.10$  mg/100 g of raw tissue by the summer and remained almost unchanged through the rest of the year (less than 0.5 mg/100 g of raw tissue). Our investigation of qualitative composition of carotenoids is based on bivalves collected in the spring and fall. We identified:  $\beta$ -carotene, echinenone, lutein, zeaxanthin, alloxanthin, fucoxanthin, amarouciaxanthin A, heteroxanthin and mactraxanthin, which account for about 80% of the total amount of carotenoids. Additionally, we have qualitatively examined carotenoid composition in other filter-feeding mollusks that co-occur in this ecotope with *P. aureus* and report the possible pathways for transformation of plant carotenoids in *P. aureus* tissues. We also compare the composition of carotenoids in the tissues of *P. aureus* and other bivalves of the genus *Polititapes* from different regions of the World Ocean.

*Keywords:* carotenoids, *Polititapes aureus*, metabolism, amarouciaxanthin A