



УДК 594.124:577.115(262.5)

© 2009

А. В. Бородина, М. В. Нехорошев, А. А. Солдатов

Особенности состава каротиноидов тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Brugiere

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. Е. Шульманом)

Досліджено склад каротиноїдів тканин чорноморського двостулкового моллюска-вселенця *Anadara (Scarpharca) inaequalvis* Br., який має виражену адаптаційну пластичність. Найвищий рівень сумарних каротиноїдів виявлено в нозі тварин — $(45,8 \pm 1,1)\%$ загального вмісту. У решті тканин (гепатопанкреас, зябра) їх вміст був нижчий — $(14,1 \pm 1,7)\%$ і $(19,1 \pm 1,2)\%$. Аналіз якісного складу каротиноїдів дозволив ідентифікувати: β - β' -каротин, діатоксантин і алоксантин, зеаксантин, 3,4,3'-тригідроксі-7',8'-дидегідро- β -каротин і цис- та транс-ізомери пектенолону, які становлять понад 70% всіх пігментів *A. inaequalvis* і переважають у всіх тканинах моллюска. На решту 30% припадають складні ефіри алоксантину і діатоксантину. В інших представників роду *Anadara* зеаксантин, цис- і транс-ізомери пектенолону та ефіри раніше виявлені не були. Можливо, присутність цих каротиноїдів у тканинах *A. inaequalvis*, пов'язана з адаптацією цього виду до умов розпріснення Чорноморського регіону (14–17%).

В последнее время исследователи все больше внимания уделяют изучению каротиноидов морского генезиса в связи с их способностью замедлять рост некоторых злокачественных образований, таких как рак простаты, молочной железы [1, 2]. Молекулярная структура каротиноидов морских гидробионтов существенно отличается от наземных организмов. В их состав входят практически все известные органические группировки и разнообразные типы связей [3]. Благодаря этому они способны нейтрализовать активные формы кислорода и свободные радикалы, обладая в большей или меньшей степени антиоксидантными свойствами. Считается, что наиболее активные каротиноиды-антиоксиданты могут содержаться у эврибионтных организмов, способных обитать в условиях с широким градиентом температуры, солености, напряжения кислорода. Одним из таких морских объектов является двустворчатый моллюск-вселенец — *Anadara inaequalvis* Br. Метаболические процессы в тканях данного вида имеют в целом анаэробную ориентацию, позволяющую ему существовать в условиях экстремальной гипоксии и аноксии [4].

В настоящей работе приведены качественные и количественные характеристики каротиноидного состава тканей *A. inaequalvis* в сравнении с другими близкородственными видами двустворчатых моллюсков.

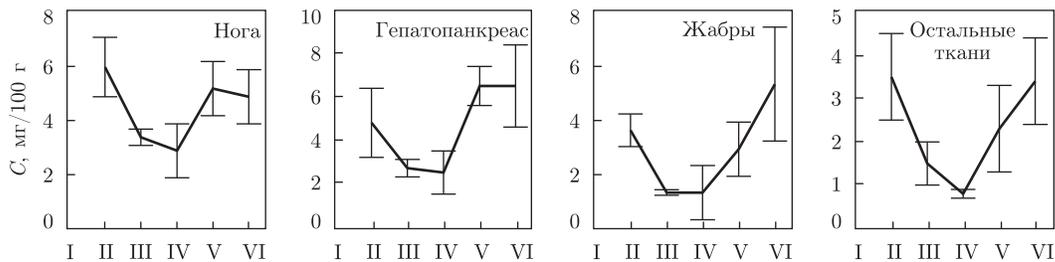


Рис. 1. Динамика суммарных каротиноидов в тканях *Anadara inaequalvis* по месяцам (с февраля по июнь)

Материал был получен с устричной фермы, расположенной в Мартыновой бухте (район Севастополя). Объектом исследования являлись особи *A. inaequalvis* (далее анадара) одного срока оседания (годовики) с длиной раковины 28–30 мм. За время наблюдения, с февраля по июнь 2007 г., анадара находилась в садках, выставленных в море. Количественный состав каротиноидов определяли по методу, предложенному Карнауховым [5]. Образцы тканей (нога, жабры, гепатопанкреас, сумма оставшихся тканей), полученные от пяти особей, объединяли. При изучении качественного состава каротиноидов анадары ацетоновые экстракты тканей упаривали в вакууме при температуре ниже 25 °С, растворяли в хлороформе и разделяли на пластинках с силикагелем (“Силуфол”, Чехия) в системе ацетон : гептан (3 : 7). Для идентификации каротиноидов использовали значения относительной подвижности (R_f), спектральные характеристики, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), масс-спектроскопию, качественные химические реакции на окси-, оксогруппы и двойные связи [1, 6]. Фракции пектенолона и эфиров каротиноидов дополнительно разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC – 6AD, снабженного колонкой длиной 250 мм с внутренним диаметром 4,6 мм с неподвижной фазой COSMOSIL 5SL-11 (растворитель ацетон : гексан (2 : 8), скорость элюанта 0,5 мл/мин, регистрация при 460 нм), и масс-спектрометре Jeol JMSHX 110 А, матрица мета-нитробензиловый спирт. Идентификацию проводили путем сравнения времени выхода и спектров UV-vis стандартных образцов. Для выделенных цис- и транс-изомеров пектенолона, эфиров каротиноидов сняты масс-спектры.

Основная масса каротиноидов у анадары была сосредоточена в ноге — $(45,80 \pm 1,12)\%$. В остальных тканях она была в 2,2–3,2 раза ниже ($p < 0,001$). При этом минимальное содержание отмечали в гепатопанкреасе моллюска — $(14,14 \pm 1,72)\%$. Подобный характер распределения не свойственен другим видам двустворок, у которых основное содержание каротиноидов приходится на гепатопанкреас [7]. Анадара обитает в придонных слоях воды с ограниченным водообменом. Она является высокоподвижным видом, активно использующим ногу при перемещении по субстрату и в толще грунта [8]. Ранее было отмечено, что в условиях внешней нормоксии в ноге анадары преобладают аэробные процессы, тогда как в других органах — анаэробные [4]. Можно предположить, что повышенное содержание каротиноидов в ноге моллюска, способных обратимо связывать кислород [5], обеспечивает ему дополнительный ресурс окислителя.

Сезонная динамика суммарных каротиноидов в тканях анадары представлена на рис. 1. В ноге и гепатопанкреасе максимальное содержание отмечали в феврале, мае и июне (4,8–6,5 мг/100 г), а минимальное — в марте-апреле (2,5–3,4 мг/100 г). Аналогичную динамику имело содержание каротиноидов в жабрах и остальных тканях. В середине весны регистрировали минимальные значения (0,8–1,5 мг/100 г), а в феврале, мае и июне — максимальные

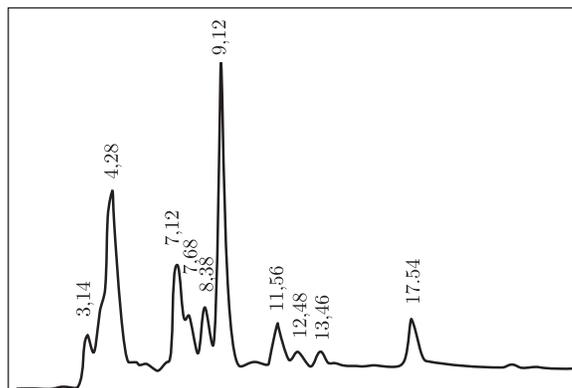


Рис. 2. HPLC хроматограмма пигментов *A. inaequalvis*: 3,14 мин — β -каротин; 4,28 мин — эфиры алло- и диатоксантина; 7,12 мин — пектенолон; 7,68 мин — зеаксантин; 8,38 мин — диатоксантин; 9,12 мин — аллоксантин; 17,54 мин — 3,4,3'-тригидрокси-7',8'-дидегидро- β -каротин или пектенол. Здесь и на рис. 3 время выхода каротиноидной фракции (мин) указано на вершинах пиков

(2,3–5,3 мг/100 г). Полученные результаты коррелировали с содержанием фитопланктона в морской воде. Абсолютные значения уровня каротиноидов в тканях *A. inaequalvis* совпадали или были несколько выше отмеченных для других представителей рода *Anadara* [9].

По результатам хроматографии идентифицированы следующие каротиноиды: β -каротин, эфиры алло- и диатоксантина, изомеры пектенолона, зеаксантин, аллоксантин, диатоксантин и 3,4,3'-тригидрокси-7',8'-дидегидро- β -каротин (рис. 2). Фракция пектенолона состояла из двух стереоизомеров: транс-пектенолона и его цис-изомера (рис. 3).

На основании данных HPLC и масс-спектрометрии идентифицированы сложные моноэфиры аллоксантина и диатоксантина. Индивидуальное количественное содержание эфиров ввиду сложного состава фракции установить не удалось, поэтому они были определены в сумме (табл. 1).

В сравнении с дальневосточными видами *Scapharca broughtonii*, *S. subcrenata*, *S. satowi*, *S. globosa* [6] у черноморской популяции *A. inaequalvis* впервые выявлены зеаксантин и стереоизомеры пектенолона.

Анализ количественного соотношения отдельных групп каротиноидов в органах *A. inaequalvis* (см. табл. 1) показал, что основными фракциями являются изомеры пектенолона, аллоксантин и эфиры алло- и диатоксантина (около 80%). Примерно такие же значения

Таблица 1. Состав и содержание каротиноидов в тканях *Anadara inaequalvis* (в мае 2007 г.)

Пигмент	Содержание в тканях, % от суммы каротиноидов			
	Нога	Гепатопанкреас	Жабры	Остальные ткани
β - β' -каротин	1,0 ± 0,2	15,1 ± 4,8	1,0 ± 0,8	2,0 ± 1,0
Пектенолон (транс-изомер)	16,7 ± 2,3	16,5 ± 0,9	14,26 ± 1,4	15,5 ± 0,9
Пектенолон (цис-изомер)	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,5
Зеаксантин	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
Аллоксантин	20,0 ± 2,8	14,8 ± 1,5	22,5 ± 1,5	20,6 ± 1,4
Диатоксантин	8,6 ± 0,6	6,3 ± 0,2	10,1 ± 0,9	8,2 ± 1,0
3,4,3'-тригидрокси-7',8'-дидегидро- β -каротин	5,5 ± 0,5	4,1 ± 0,3	12,6 ± 1,9	10,3 ± 2,1
Сложные эфиры алло- и диатоксантина	40,0 ± 2,5	35,0 ± 3,0	35,0 ± 1,0	34,0 ± 2,0

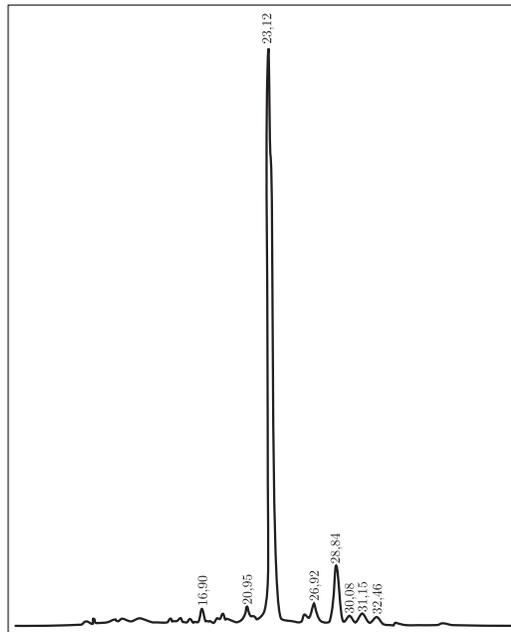


Рис. 3. HPLC фракции пектенолона: 23,12 мин — транс-изомер пектенолона; 28,84 мин — 9-цис-изомер пектенолона

были получены для дальневосточной популяции *A. broughtonii* в начале 1980-х гг. [6]. Однако исследование спектра каротиноидов у этого вида спустя 10 лет показало увеличение доли пектенолона в тканях до 70% [7]. По химическому строению пектенолон, в отличие от других каротиноидов, содержащихся в анадаре, наиболее близок к астаксантину — одному из самых сильных природных антиоксидантов [2].

Отмечено, что цис- и транс-изомеры каротиноидов гидробионтов, таких как алло- и диатоксантина, фукоксантинов характеризуются различной биологической активностью, причем в отличие от наземных организмов, у которых преобладают цис-изомеры, у водных животных доминируют соединения транс-конфигурации [10]. Нами установлено, что у *A. inaequalvis* также преобладает транс-пектенолон (см. рис. 3, табл. 1). В сравнении в цис-формой данного каротиноида различия составляют 7–10 раз ($p < 0,001$).

Таким образом, распределение каротиноидов в организме *A. inaequalvis* имеет выраженную тканевую специфику. Около 50% каротиноидов сосредоточено в ноге моллюска, что отличает его от других видов двустворок. Доминирующими фракциями являются изомеры пектенолона, аллоксантин и эфиры алло- и диатоксантина (около 80%). Каротиноидный состав *A. inaequalvis* отличается присутствием зеаксантина и двух изомерных форм пектенолона, причем основным стереоизомером является транс-пектенолон, который обладает более выраженными антиоксидантными свойствами.

Авторы выражают благодарность Dr. Takashi Maoka и Dr. Naoshige Akimoto (г. Киото, Япония) за снятие спектров HPLC и масс-спектров, а также за дискуссию при написании данной работы.

1. Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. Characterization of Fucoxanthin and Fucoxanthinol Esters in the Chinese Surf Clam, *Macra chinensis* // J. Agr. and Food Chem. – 2007. – No 55. – С. 1563–1567.

2. *The 15th International Symposium on Carotenoids* (Okinawa, Japan, June 22–27, 2008). – Okinawa, 2008. – 78 p.
3. *Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids Handbook / Comp. A.Z. Mercadante, E.S. Ege-land.* – Basel, 2004. – 672 p.
4. *Солдатов А. А., Андреевко Т. И., Головина И. В.* Особенности организации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска – вселенца *Anadara inaequalis* Bruguiere // Доп. НАН України. – 2008. – № 4. – С. 161–165.
5. *Карнаузов В. Н.* Биологические функции каротиноидов. – Москва: Наука, 1988. – 240 с.
6. *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. Fish. – 1981. – **47**, No 4. – P. 495–499.
7. *Поспелова Н. В., Нехоросhev М. В.* Содержание каротиноидов в системе “взвешенное вещество – мидия (*Mytilus galloprovincialis* LMK.) – биоотложения мидий” // Экология моря. – 2003. – **64**. – С. 62–66.
8. *Brenko M., Legac M.* A review of bivalve species in the eastern Adriatic Sea. 2. Pteromorpha (Arcidae and Noetidae) // Nat. Croat. – 1996. – **5**, No 3. – P. 221–247.
9. *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 // J. Korean Soc. Food Nutr. – 1989. – **18**, No 1. – P. 71–92.
10. *Konishi I., Hosokawa M., Sashima T. et al.* 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**, No 3. – P. 181–189.

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

Поступило в редакцию 24.10.2008

A. V. Borodina, M. V. Nekhoroshev, A. A. Soldatov

Unusual carotenoids composition of tissues of bivalve *Anadara inaequalis* Bruguiere

*We study carotenoids in the Black sea bivalve shellfish *Anadara inaequalis* Br. The highest level of total carotenoids was marked in the foot of animals (45.8 ± 1.1)% from common maintenance. In the other tissues (hepatopancreas, gills), the percentage was less: (14.1 ± 1.7) and (19.1 ± 1.2)%. The analysis of the high-quality composition of carotenoids allowed to identify: β - β' -carotene, diatoxanthin and alloxanthin, zeaxanthin, 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- β -carotene and cis-trans-isomer pectenolon, more than 70% are from the general pool of pigments of *S. inaequalis* and prevail in all tissues of shellfish. The other 30% are ethers of alloxanthin and diatoxanthin. At other representatives of genus *Anadara*, zeaxanthin, cis-trans-isomers of pectenolon, and ethers were not found before. Possibly, finding it in tissues of the Black sea population of *A. inaequalis* can be related to the adaptation of this species to the freshness aquatoria of the Black sea region (14–17%).*