

ГЛУТАТИОНОВЫЙ АНТИОКСИДАНТНЫЙ КОМПЛЕКС И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ КАРОТИНОИДОВ ТКАНЕЙ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© А. А. Солдатов, О. Л. Гостюхина, А. В. Бородина, И. В. Головина

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия
E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Резюме

Изучена зависимость состояния глутатионного комплекса тканей: восстановленный глутатион (GSH), активности глутатионредуктазы (GR) и глутатионпероксидазы (GP) — от качественного состава каротиноидов у двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Установлена отрицательная корреляция для системы «GP-пектенол А» ($R^2 > 0.988$). Это допускает наличие конкурентных отношений между этими молекулярными системами за активные формы кислорода (АФК). Аналогичная закономерность показана для GR и большинства каротиноидов: транс- и цис-пектенолона, аллоксантина, β -каротина, зеаксантина и диатоксантина ($R^2 > 0.75$). В отношении GSH были получены противоположные результаты ($R^2 > 0.9$). Обсуждаются причинно-следственные связи установленных закономерностей.

Ключевые слова: каротиноиды, глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, ткани, двустворчатые моллюски.

Введение

Нейтрализация активных форм кислорода (АФК) и поддержание окислительно-восстановительного статуса — важная составляющая метаболизма клеточных систем. Она достигается при участии специфических ферментных комплексов (семейств каталаз и супероксиддисмутаз, пероксиредоксинов, глутатионовой и тиоредоксиновой систем и др.) [1], а также группы низкомолекулярных соединений: аскорбиновой кислоты, α -токоферола, каротиноидов [2, 3] и т. д.

Особый интерес представляют организмы, подверженные значительной естественной окислительной нагрузке. К ним относятся двустворчатые моллюски-фильтраторы, аккумулирующие в тканях разнообразные группы ксенобиотиков [4]. Уровень ТБК-активных продуктов, диеновых конъюгатов в их тканях существенно превышает значения, известные для других систематических групп организмов [5]. Они имеют высокоэффективный антиоксидантный (АО) ферментный комплекс. Ресурс восстановленного глутатиона (GSH) в их тканях, активности сопряженных с ним ферментов: глутатионредуктазы (GR), глутатионпероксидазы (GP), глутатионтрансферазы (GT), многократно

превышают значения известные для наземных позвоночных [6—9]. Аналогичные данные получены и в отношении супероксиддисмутазы (SOD) и каталазы (CAT) [6, 8, 10].

Важной особенностью моллюсков-фильтраторов являются также накопление и направленный метаболизм широкого спектра каротиноидов в тканях [11, 12]. Эта группа соединений существенно дополняет АО статус тканей. Показана их способность эффективно перехватывать $^1\text{O}_2$ [13, 14]. Одновременное присутствие эффективного АО ферментного комплекса и разнообразных каротиноидных пигментов позволяет оценить коэргические отношения этих молекулярных систем. Ранее выполненные исследования позволили выявить конкурентные отношения между суммарным уровнем каротиноидов и компонентами АО комплекса тканей [15], а также между SOD и CAT, с одной стороны, и отдельными видами каротиноидов — с другой [16]. Настоящая работа является продолжением начатых исследований. В ней анализируются коррелятивные отношения между составляющими глутатионного комплекса и качественным составом каротиноидов в тканях двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906).

Материал и методы

Объектом исследования являлись взрослые особи двусторчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (далее анадара). Продольная ось раковины — 25—33 мм. Материал собирали с коллекторных установок мидийно-устричной фермы «ООО Яхонт Ltd.» (пос. Кацивели, Южный берег Крыма). После сбора и транспортировки моллюсков содержали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2—3 сут для снятия стресса [17].

Качественный состав каротиноидов. Образцы тканей (жабры, гепатопанкреас, нога) извлекали из раковин, обсушивали на фильтровальной бумаге и взвешивали на торсионных весах WT-2 (4000) (Польша). Полученные пробы гомогенизировали в фарфоровой ступке с кварцевым стеклом при соблюдении мер предосторожности, рекомендуемых при работе с пигментами [18]. Экстракцию пигментов проводили в темноте при 15—20 °С. В качестве трансформирующей среды применяли 90%-ный ацетон в следующем соотношении: 1 часть тканей — 5 частей растворителя. Образцы хранили в течение суток в холодильнике при –20 °С. Далее полученные суспензии центрифугировали при 1500 об·мин⁻¹ на центрифуге ОПН-3 в течение 10—15 мин. Надосадочную жидкость фильтровали для удаления остатков тканей. При длительном хранении полученные образцы доводили до сухого состояния: упаривали в вакууме в роторном испарителе при температуре не выше 25 °С. Под потоком аргона сухие пробы запаивали в ампулы и помещали в черные пакеты [19].

Общее содержание каротиноидов в ацетоновых экстрактах определяли по методу Карнаухова [20].

Пигменты разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC-6AD (L-6200 Intelligent pump with L-4250 UV-VIS detector Hitachi, Tokyo, Japan), снабженного колонкой длиной 250 мм и внутренним диаметром 4.6 мм с неподвижной фазой COSMOSIL 5SL-11 (ацетон—гексан, 2:8, скорость подачи элюента 0.5 мл·мин⁻¹, регистрация при 450 нм). При проведении HPLC для более точного разделения и идентификации применяли колонки с обращенной фазой (ODS). В качестве элюента использовали хлороформ—метанол в соотношении 1:9 при скорости подачи образца 0.5 мл·мин⁻¹. Сложные эфиры каротиноидов были предварительно выделены и подвержены реакции омыления в 10%-ном растворе КОН в метаноле при комнатной температуре в течение 2 ч. После гидролиза образцы были также исследованы с помощью HPLC на колонке с ODS. Количественное содержание каротиноидов оценивали по результатам HPLC с учетом коэффициента экстинкции $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2500$ при 450 нм.

Компоненты HPLC хроматограммы при помощи UV-VIS и масс-спектров были идентифицированы нами ранее [16].

Глутатионовый комплекс. Препарирование и гомогенизацию тканей выполняли при 0—4 °С с использованием ледяной бани. В качестве трансформирующей среды применяли 1.15%-ный раствор KCl (фер-

менты) и 5%-ный раствор метафосфорной кислоты (глутатион). Полученные гомогенаты центрифугировали при 6000 об·мин⁻¹ (3200 g) в течение 15 мин с помощью рефрижераторной центрифуги K-23D (Германия).

Активность глутатионпероксидазы (GP) (КФ 1.11.1.9) оценивали по накоплению окисленного глутатиона [21]. В состав реакционной среды входили 1 мл 0.3 М фосфатного буфера (pH 7.4), включающего 12 mM азида натрия, 6 mM ЭДТА, 0.5 мл 2.5 mM восстановленного глутатиона (GSH), 0.5 мл 1.8 mM H₂O₂, 20—200 мкл KCl-супернатанта ткани. Запуск реакции осуществляли внесением перекиси водорода и останавливали через 2 мин добавлением 1 мл 10%-ного ТХУ. После центрифугирования при 3000 об·мин⁻¹ в течение 15 мин определяли экстинкцию окисленного глутатиона (GSSG) при длине волны 260 нм. Активность GP выражали в $\mu\text{моль GSSG} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка.

Определение активности глутатионредуктазы (GR) (КФ 1.8.1.7) основано на регистрации убыли NADP·H₂. Использовали реакционную среду, содержащую 2 мл 0.05 М фосфатного буфера (pH 8.0), 0.2 мл 1 mM ЭДТА, 0.5 мл 7.5 mM GSSG, 0.1 мл 1.2 mM NADP·H₂, 0.05—0.2 мл KCl-супернатанта ткани. Активность фермента определяли по убыли NADP·H₂ в течение 5 мин при длине волны 340 нм и выражали в $\mu\text{моль NADP} \cdot \text{H}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка [21].

Содержание восстановленного глутатиона (GSH) оценивали спектрофотометрически по реакции с аллоксановым реактивом [22]. Поглощение продукта реакции определяли при длине волны 305 нм. Уровень данного соединения в тканях выражали в мкг GSH·г⁻¹ ткани.

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури. Измерение активности ферментов проводили при температуре 25.0 ± 0.5 °С. В работе использовали спектрофотометр СФ-26.

Статистические сравнения выполняли на основе *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены как $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Нормальность распределения проверяли при помощи критерия Пирсона. Объем выборочных совокупностей составлял 38—40 особей. Статистическая обработка, корреляционный анализ и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 7). Оценка достоверности корреляционных связей проводилась по методу Пирсона.

Результаты исследований

Качественный состав каротиноидов. На рис. 1, А представлена HPLC хроматограмма. При скорости подачи элюента 0.5 мл·мин⁻¹ в течение 20 мин удалось выделить 8 компонентов. Время выхода каждого обозначено на графике. Из них 5 были идентифицированы нами ранее [16]: β -каротин (3.14), зеаксантин (7.68), диатоксантин (8.38), аллоксантин (9.12) и пектенол А (17.54). Компонент 7.12 был дополнительно разделен на колонке ODS, что позволило получить две самостоятельные фракции: транс- и цис-пектено-

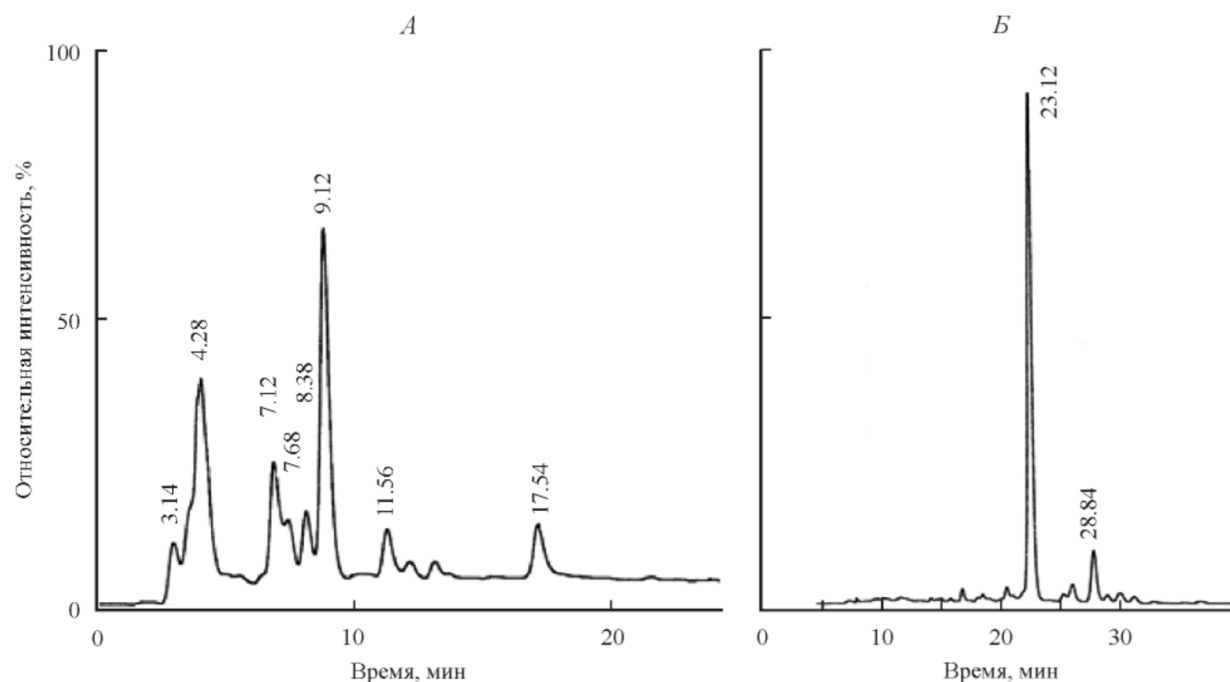


Рис. 1. HPLC в системе ацетон—гексан (А, Б) суммарных экстрактов каротиноидов анадары (на вершине пиков хроматограммы указано время выхода каждой фракции).

Таблица 1

Содержание каротиноидов (%) в тканях анадары

Виды каротиноидов	Виды тканей		
	гепатопанкреас	жабры	нога
Транс-пектенолон	24.1 ± 1.4	16.6 ± 1.5*	26.7 ± 1.2
Аллоксантин	18.5 ± 3.1	19.2 ± 1.1	18.1 ± 2.1
Пектенол А	17.6 ± 3.5	14.4 ± 1.5	6.2 ± 1.7**
β-каротин	11.1 ± 1.0	—	4.7 ± 0.1**
Диатоксантин	7.9 ± 1.0	8.2 ± 1.9	7.7 ± 2.1
Зеаксантин	3.0 ± 0.8	2.3 ± 0.8	4.5 ± 0.8***
9-цис-пектенолон	3.0 ± 1.0	2.1 ± 0.9	3.3 ± 1.2
Сумма эфиров каротиноидов	14.5 ± 3.4	37.3 ± 5.0	28.7 ± 5.5

Примечание. Число особей 38—40; отличия достоверны ($p \leq 0.05$): * — между жабрами и остальными тканями, ** — между ногой и остальными тканями, *** — между ногой и жабрами.

Таблица 2

Тканевая специфика состояния глутатионного комплекса анадары

Показатели	Виды тканей		
	гепатопанкреас	жабры	нога
GSH, мкг GSH · г ⁻¹ ткани	384.8 ± 79.3	221.0 ± 85.7	871.9 ± 176.2*
GP, μмоль GSSG · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка	8.50 ± 2.43	16.93 ± 3.53	21.14 ± 2.72**
GR, μмоль NADP · H ₂ · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка	145.3 ± 44.5	167.4 ± 39.7	77.9 ± 26.0***

Примечание. Число особей 38—40; отличия достоверны: * — между ногой и остальными тканями ($p \leq 0.05$), ** — между ногой и гепатопанкреасом ($p \leq 0.01$), *** — между ногой и жабрами ($p \leq 0.05$).

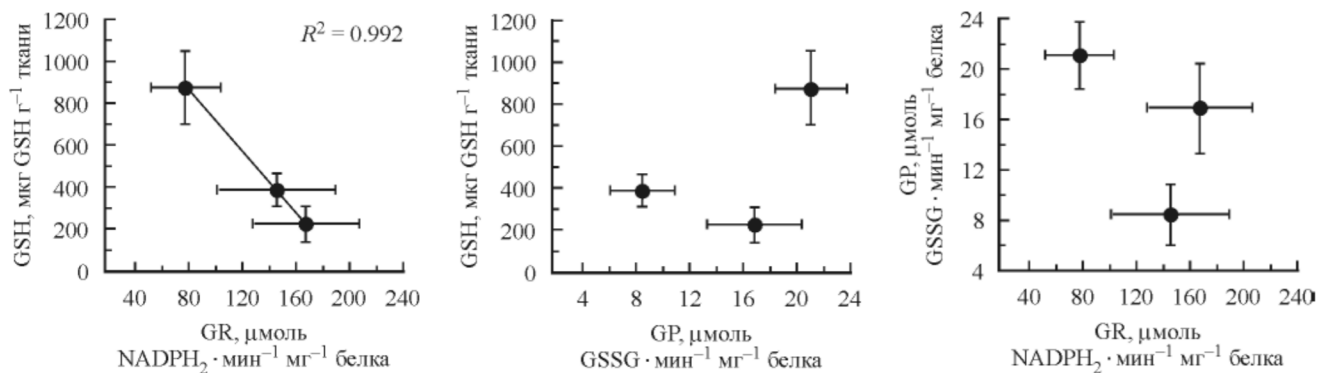


Рис. 2. Взаимосвязь между составляющими глутатионного комплекса в суммарных экстрактах тканей анадары (левый график: $GSH \leftarrow GR$, средний график: $GSH \leftarrow GP$, правый график: $GP \leftarrow GR$).

лона (рис. 1, Б), которые также были определены ранее [16]. Содержание транс-пектенолона было в 9 раз выше.

Анализ качественного состава каротиноидов в тканях моллюска не выявил принципиальных отличий (табл. 1). В гепатопанкреасе, ноге и жабрах моллюска явно доминировали транс-пектенолон, аллоксантин и пектенол А. На них приходилось 50—60 % состава каротиноидных пигментов. Доля остальных (β -каротин, цис-пектенолон, зеаксантин, диатоксантин) без учета суммы эфиров была явно ниже. Количественное же соотношение каротиноидов имело выраженную тканевую специфику. Достоверные различия отмечали в содержании транс-пектенолона, зеаксантина и пектенола А. В остальных случаях они не были статистически выражены.

Состояние глутатионного комплекса. Самый высокий уровень восстановленного глутатиона (GSH) был обнаружен в ноге моллюска (табл. 2). В остальных органах (жабры, гепатопанкреас) он был в 2—4 раза ниже ($p < 0.05$). Для этого же органа была отмечена наивысшая активность глутатионпероксидазы (GP). Она на 20 % превышала значения, зарегистрированные для жабр и в 2.5 раза — полученные для гепатопанкреаса. В последнем случае различия были достоверны ($p < 0.01$). В отношении глутатионредуктазы (GR) ситуация была противоположна. Максимум активности GR отмечали в жабрах. Близкие значения были получены для гепатопанкреаса. При этом в ноге активность GR была в 1.9—2.1 раза ниже. В сравнении с жабрами различия были статистически выражены ($p < 0.05$).

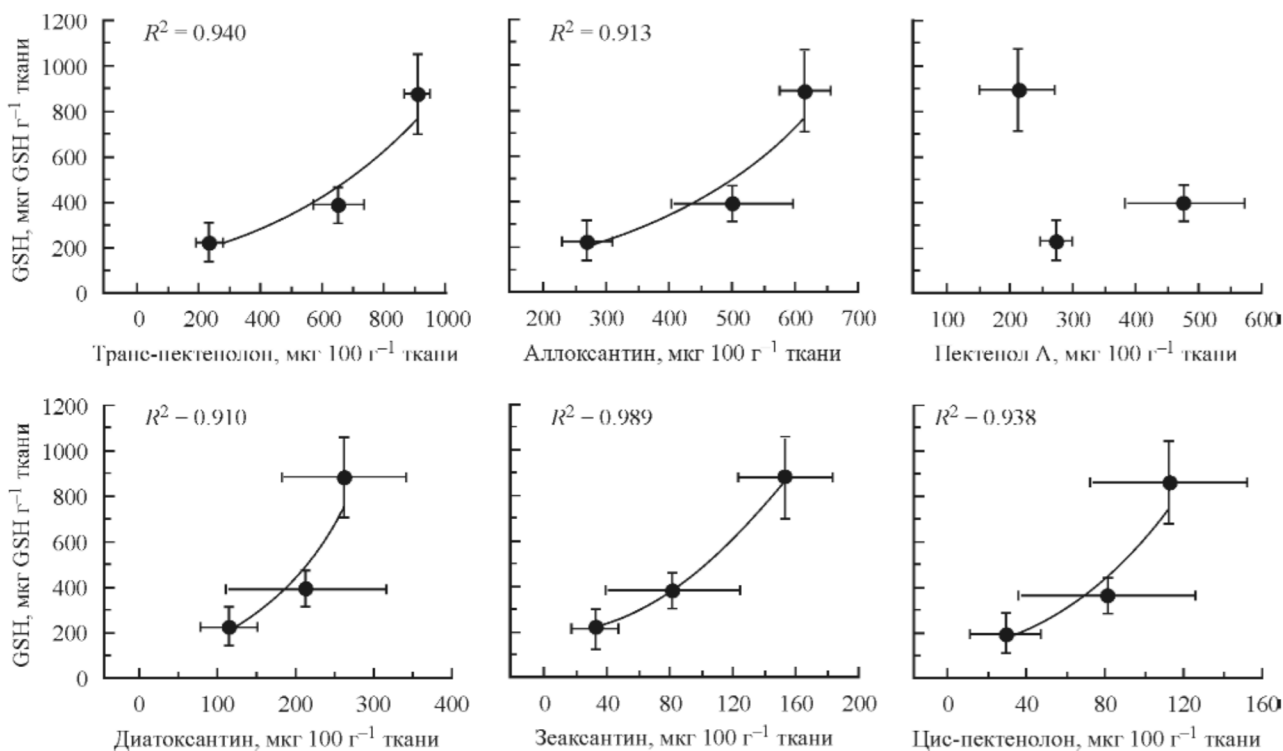


Рис. 3. Взаимосвязь между содержанием отдельных каротиноидов и уровнем GSH в суммарных экстрактах тканей анадары.

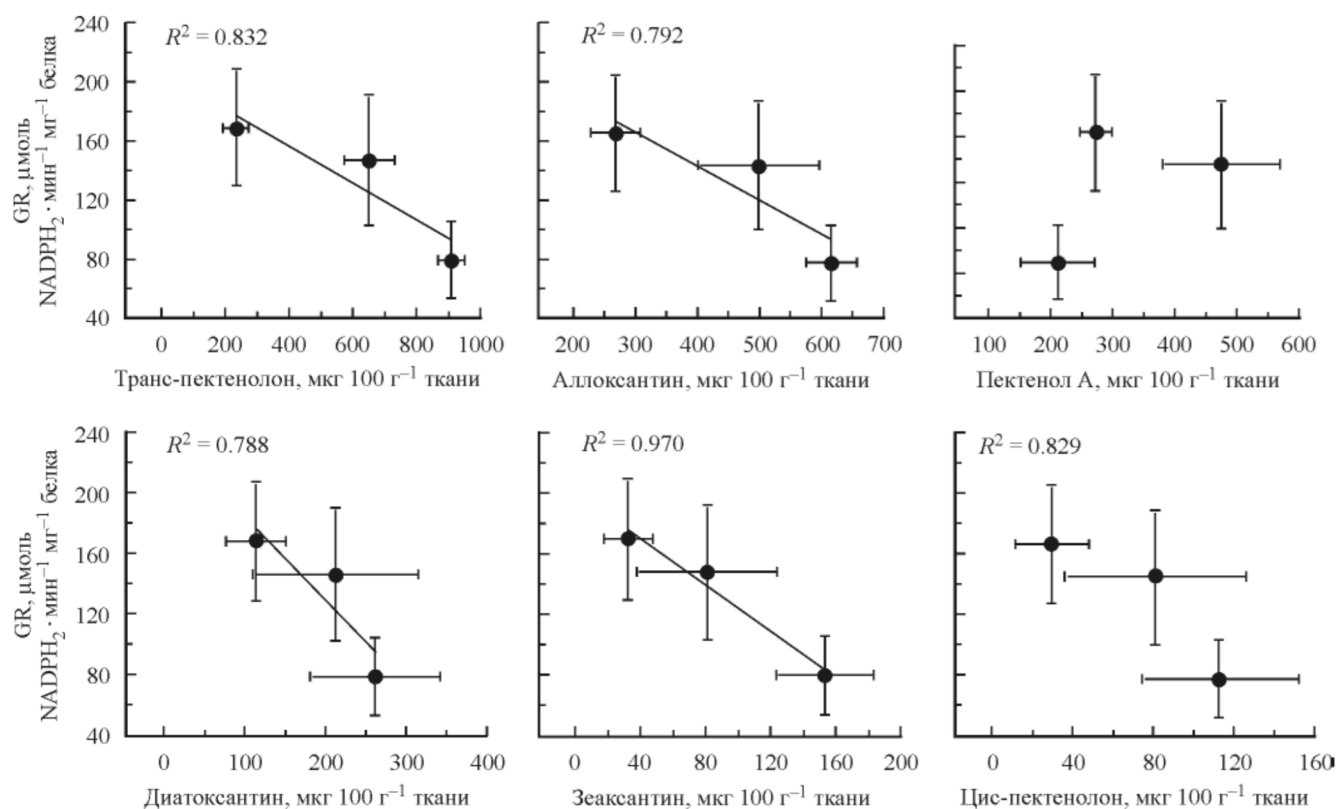


Рис. 4. Взаимосвязь между содержанием отдельных каротиноидов и активностью GR в суммарных экстрактах тканей анадары.

Корреляционный анализ. Анализ корреляционных связей между показателями глутатионного комплекса и содержанием каротиноидов в рамках одной и той же ткани позволил выявить лишь общий тренд изменений при сравнительно невысоких значениях коэффициента детерминации (R^2 0.35—0.45). Это было обусловлено тем, что размах колебаний зарегистрированных на тканевом уровне величин был невелик. Разница между минимальными и максимальными значениями для уровня каротиноидов в тканях не превышала 65 %, а для параметров глутатионной системы — 60 %. На межтканевом уровне различия были более выражены: 4—7 раз (глутатионный комплекс), 2—3 раза (содержание каротиноидов). Это позволило получить более однозначные зависимости при R^2 выше 0.75.

В глутатионовом комплексе выявлена отрицательная связь между активностью GR и содержанием GSH при R^2 близком к единице ($p < 0.05$) (рис. 2). Для остальных комбинаций «GP-GSH», «GP-GR» зависимости не были установлены.

Положительная корреляция описана между содержанием в тканях пяти видов каротиноидов (транс- и цис-пектенолона, зеаксантина, аллоксантина и диатоксантина) и уровнем восстановленного глутатиона (GSH) ($R^2 > 0.9$) (рис. 3). В отношении зеаксантина, транс- и цис-пектенолона корреляционные отношения были достоверны ($p < 0.05$). В остальных случаях они носили характер тенденции. Для пектенола А зависимость вообще не проявлялась.

Отрицательная связь показана для системы «GR-каротиноиды» (рис. 4). Величины R^2 превышали 0.75, за исключением пектенола А. В отношении зеаксантина, транс- и цис-пектенолона зависимости были достоверны ($p < 0.05$).

Для GP установлена негативная корреляция только в отношении содержания в тканях пектенола А ($R^2 > 0.988$, $p < 0.05$) (рис. 5). В остальных случаях она не выявлялась.

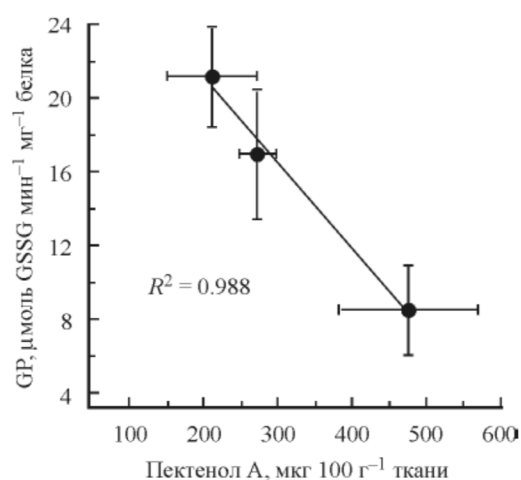
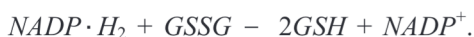


Рис. 5. Взаимосвязь между содержанием пектенола А и активностью GP в суммарных экстрактах тканей анадары.

Обсуждение результатов

Глутатионовый комплекс. Анализ состояния глутатионовой системы показал наличие отрицательной связи между тканевым ресурсом GSH и активностью GR ($R^2 > 0.9$; $p < 0.05$). Это ожидаемо ввиду консервативности GR, использующего в качестве донора электрона $\text{NADP} \cdot \text{H}_2$ для восстановления окисленного глутатиона (GSSG):



Наличие обратной связи между GR и GSH позволяет говорить о том, что регуляция активности GR осуществляется по конечному продукту. Межтканевое сравнение показывает, что наибольшей окислительной нагрузке подвергаются жабры моллюска: содержание GSH в них минимально, а активность GR достигает максимальных значений. Это периферический орган, который непосредственно контактирует с окружающей средой и испытывает на себе ее токсическое действие, что отмечалось нами ранее [8].

В отношении GP, использующего ресурс GSH для восстановления H_2O_2 , связь не была установлена:



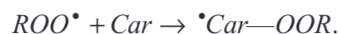
Это может быть обусловлено тем, что GSH может быть задействован не только в данной реакции, но и других процессах, например в поддержании уровня восстановленного глутаредоксина (Grx) в клетке [23]. Известна также способность GSH к непосредственной нейтрализации различных форм АФК [24, 25].

Каротиноиды. Из представленных выше результатов следует, что содержание 6 из 7 идентифицированных каротиноидов в тканях моллюска проявляет выраженную корреляцию с уровнем GSH и активностью GR. К ним относятся зеаксантин, транс- и цис-пектенолоны, алло- и диатоксантины и β -каротин. Три из них моллюск получает в процессе фильтрационного питания: диатоксантин, зеаксантин и β -каротин. В значительных количествах они обнаружены у зеленых, золотистых, диатомовых микроводорослей [11]. Остальные являются результатом направленной метаболической трансформации. Особо следует обратить внимание на аллоксантин, транс- и цис-пектенолоны, которые являются терминальными соединениями в этих процессах и, по-видимому, функционально значимы для моллюска. На их долю приходилось 35—50 % от общего содержания каротиноидов в тканях. Поэтому при оценке корреляционных зависимостей с компонентами глутатионовой системы следует обращать внимание прежде всего на тканевый ресурс этих соединений. Избирательное накопление в тканях моллюска транс-пектенолона и аллоксантина, по всей видимости, обусловлено особенностями их структуры и локализацией в клетке [26, 27].

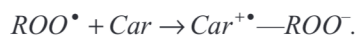
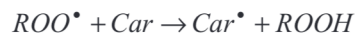
Глутатионовый комплекс и каротиноиды. Факт способности GSH самостоятельно нейтрализовать достаточно широкий спектр АФК ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, $\text{OH}^{\cdot}$) [24, 25] важен для понимания положительной корреляции со-

держания этого соединения с уровнем каротиноидов в тканях моллюска ($R^2 > 0.9$). Исследования последних лет показали способность многих каротиноидов непосредственно перехватывать $\text{O}_2^{\cdot-}$ в клетке [29]. Особенно они эффективны в нейтрализации $^1\text{O}_2$. Их способность к перехвату этого радикала в десятки раз выше, чем у α -токоферола [13, 29]. Это позволяет предположить более высокое сродство каротиноидов к перечисленным АФК. В этом случае роль GSH в нейтрализации $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, $\text{OH}^{\cdot}$ понижается, что приводит к увеличению содержания этого соединения в тканях на фоне роста уровня каротиноидов. Одновременно наблюдается и снижение активности GR, направленное на восстановление GSSG, показанное в настоящей работе.

Известны также пути прямой нейтрализации гидроперекисей жирных кислот со стороны каротиноидов [30—32]. Процесс может быть реализован несколькими путями. Возможно присоединение радикала жирных кислот ($\text{ROO}^{\cdot}$) по цепи сопряженных двойных связей с образованием радикального аддукта ($^{\cdot}\text{Car}-\text{OOR}$) [14]:



Не исключен вариант отрыва атома водорода от аллильного фрагмента каротиноида или перенос электрона от каротиноида с образованием его катион-радикала ($\text{Car}^{+\cdot}$) [33, 34]:



В нейтрализации гидроперекисей непосредственное участие принимает и GP, которая сопряжена с ресурсом восстановленного GSH. Фермент обладает высоким сродством к гидроперекисям и способен перехватывать их в крайне низких концентрациях [35]. Анализ корреляционных отношений в системе «GP—каротиноиды» позволил выявить отрицательную связь только в отношении пектенола А. В остальных случаях она не была обнаружена. Как уже отмечалось, пектенол А относится к мажорной группе каротиноидов и направленно синтезируется в тканях моллюска из диатоксантина, получаемого в ходе фильтрационного питания [11]. На него приходится 6—18 % от общего содержания каротиноидных пигментов тканей. Отличительной чертой пектенола А является асимметричность строения и сравнительный избыток спиртовых групп, в связи с чем он может быть эффективным донором H^+ , необходимых для восстановления гидроперекисей [23—25].

Рассмотренные выше результаты настоящего исследования в целом не вписываются в концепцию о том, что антиоксидантный эффект каротиноидов определяется только их содержанием [11]. Напротив, роль этих соединений в АО процессах прежде всего определяется их структурно-функциональными характеристиками, а также местом локализации в клетке.

Таким образом, проанализированы корреляционные отношения между компонентами глутатионного комплекса тканей анадары и семью видами идентифицированных в них каротиноидов: транс- и цис-пектенолонами, аллоксантином, пектенолом А, β -каротином, зеаксантином и диатоксантином. Обнаружена положительная связь ($R^2 > 0.9$) между уровнем GSH в тканях и содержанием большинства каротиноидов. Отрицательная корреляция показана для систем «GR—каротиноиды» ($R^2 > 0.75$) и «GP—пектенол А» ($R^2 > 0.988$), что допускает наличие конкурентных отношений между этими молекулярными системами за АФК.

Благодарности. Выражаем признательность японским коллегам (Research Institute for Production Development, Kyoto, Japan) и лично доктору Т. Маока за помощь в проведении HPLC и снятии спектров FAB MS.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00135а.

Список литературы

- [1] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // *Exp. Physiol.* 1997. V. 82. P. 291—295.
- [2] Padayatty S. J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J. H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S. K., Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention // *J. Am. Coll. Nutr.* 2003. V. 22. P. 18—35.
- [3] Traber M. G., Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. P. 4—15.
- [4] Sheehan D., McIntosh J., Power A., Fitzpatrick P. J. Environmental biochemistry // *Biochem. Soc. Trans.* 1995. V. 23. P. 419—422.
- [5] Romeo M., Gnassia-Barelli M. Effect of heavy metal on lipid peroxidation in the Mediterranean clam, *Ruditapes decussatus* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1997. V. 118. P. 33—37.
- [6] Viarengo A., Canesi L., Garcia-Martinez P., Peters L. D., Livingstone D. R. Pro-oxidant processes and antioxidant defense systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. V. 111 B. P. 119—126.
- [7] 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. V. 45. P. 106—121.
- [8] 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. эвол. биохим. и физиол.* 2008. Т. 44. С. 150—155.
- [9] Солдатов А. А., Андреев Т. И., Головина И. В., Столбов А. Я. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2010. Т. 46. С. 284—290.
- [10] 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 Environ.* 2001. V. 281. P. 237—246.
- [11] *Carotenoids. Biosynthesis and Metabolism* (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. — eds). V. 3. Birkhauser, Basel, Switzerland, 1998. 414 p.
- [12] *Carotenoids. Natural Functions* (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. — eds). V. 4. Birkhauser, Basel, Switzerland, 2008. 370 p.
- [13] Shimidzu N., Goto M., Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms // *Fisheries Science.* 1996. V. 62. 1996. P. 134—137.
- [14] Поляков Н. Э., Лешина Т. В. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование // *Успехи химии.* 2006. Т. 75. С. 1175—1192.
- [15] Гостюхина О. Л., Солдатов А. А., Головина И. В., Бородин А. В. Содержание каротиноидов и состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей у двусторчатого моллюска *Anadara inaequalis* Br. // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2012. Т. 48. С. 542—557.
- [16] Солдатов А. А., Гостюхина О. Л., Бородин А. В., Головина И. В. Качественный состав каротиноидов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в тканях двусторчатого моллюска *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1789) // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2013. Т. 49. С. 255—263.
- [17] 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. V. 28. P. 279—283.
- [18] Maoka T., Akimoto N. Natural product chemistry in carotenoid some experimental techniques for structural elucidation and analysis of natural carotenoids // *Carotenoid Science (Mini-review).* 2008. V. 13. P. 10—17.
- [19] Repeta D. J., Bjornland T. Preparation of carotenoid standards, in phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO: Paris, 1997. P. 239—260.
- [20] Карнаухов В. Н. Биологические функции каротиноидов, М.: Наука, 1988. 312 с.
- [21] Переслегина И. А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // *Лаб. дело.* 1989. Т. 11. С. 20—23.
- [22] Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях. В кн.: Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. С. 183—186.
- [23] Terao J. Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution // *Lipids.* 1989. V. 24. P. 659—661.
- [24] Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Биологическая роль глутатиона // *Успехи соврем. биологии.* 1990. Т. 110. С. 20—33.
- [25] Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // *Успехи соврем. биологии.* 1993. Т. 113. С. 442—455.
- [26] Woodall A. A., Britton G., Jackson M. J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1336. P. 575—586.
- [27] Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function // *J. FASEB.* 1995. V. 9. P. 1551—1558.
- [28] Fernandes A. P., Holmgren A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. V. 6. P. 63—74.
- [29] Yeum K.-J., Aldini G., Russell R. M., Krinsky N. I. Carotenoids. Antioxidant/Pro-oxidant Actions of Carotenoids

- (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. — eds). V. 5. Switzerland, Basel, Birkhauser, 2009. P. 235—262.
- [30] Maoka T., Hashimoto K., Akimoto N., Fujiwara Y. Structures of five new carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas* // J. Nat. Prod. 2001. V. 64. P. 578—581.
- [31] Martin H. D., Ruck C., Schmidt M., Sell S., Beutner S., Mayer B., Walsh R. Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions // Pure Appl. Chem. 1999. V. 71. P. 2253—2262.
- [32] El-Agamey A., Lowe G. M., McGarvey D. J., Mortensen A., Phillip D. M., Truscott T. G., Young A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 430. P. 37—48.
- [33] Hill T. J., Land E. J., McGarvey D. J., Schalch W., Tinkler J. H., Truscott T. G. Interactions between carotenoids and the ccl3o2-center-dot radical // Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 8322—8326.
- [34] Woodall A. A., Britton G., Jackson M. J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxyl radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1336. P. 575—586.
- [35] Bhabak K. P., Muges G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants // Acc. Chem. Res. 2010. V. 43. P. 1408—1419.

Поступила 10 М 2016

GLUTATHIONE ANTIOXIDANT COMPLEX AND QUALITATIVE COMPOSITION
OF CAROTENOIDS IN TISSUES OF THE BIVALVE MOLLUSK *ANADARA KAGOSHIMENSIS*
(TOKUNAGA, 1906)

A. A. Soldatov, O. L. Gostyukhina, A. V. Borodina, and I. V. Golovina

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, Russian Academy of Sciences,
Sevastopol, Russia

ABSTRACT

Tissue specificity of the state of glutathione complex — reduced glutathione (*GSH*), activity of glutathione reductase (*GR*) and glutathione peroxidase (*GP*) — was investigated in the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Using high performance liquid chromatography, UV-VIS-spectra and mass spectra, 7 types of carotenoids (trans- and cis-pectenolon, alloxanthin, pectenol A, β -carotene, zeaxanthin and diatoxanthin) were identified in tissues of this species and their quantitative ratio was determined. A positive correlation ($R^2 > 0.9$) between the *GSH* levels in tissues and the content of most carotenoids was found. Negative correlation was shown for the systems «*GR*-carotenoids» ($R^2 > 0.75$) and «*GP*-pectenol A» ($R^2 > 0.988$). The cause-and-effect relations of these findings are considered.

Key words: carotenoids, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, tissues, bivalve mollusks.