

## ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ГЕМОЛИМФЕ И БЕЛКОВОМ ГИДРОЛИЗАТЕ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© 2024 г. Н. А. Голубь<sup>1,\*</sup>, А. А. Солдатов<sup>1</sup>, В. И. Рябушко<sup>1</sup>,  
А. В. Кузнецов<sup>1</sup>, В. П. Курченко<sup>2</sup>, Е. В. Будкевич<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

<sup>2</sup> Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь

<sup>3</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

\* e-mail: ngolub66@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 18.12.2023 г.

Двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) является видом-вселенцем в Чёрное и Азовское моря. Изучали аминокислотный состав гемолимфы и белковых гидролизатов мягких тканей моллюска. Методом ионообменной хроматографии с последующей нингидриновой детекцией определено содержание 16 протеиногенных аминокислот в пробах. Отмечены высокие концентрации гистидина и пролина в гемолимфе и мягких тканях моллюска. Под влиянием экспериментальной гипоксии выявлены качественные и количественные изменения в содержании свободных аминокислот, как гемолимфы, так и гидролизатов мягких тканей, в частности, отмечено уменьшение в два раза пула алифатических аминокислот и возрастание пула ароматических аминокислот. В условиях гипоксии почти вдвое снижается весовая доля мягких тканей анадары, по сравнению с нормальными условиями обитания – 4.7% в опыте и 8.2% в контроле. Это приводит к ухудшению показателей гидролизатов по общему и аминному азоту, а также сухим веществам (0.34 и 1.84% от сухого вещества при гипоксии и нормоксии). Показано, что в условиях гипоксии метаболизм моллюска реорганизуется в направлении анаэробного катаболизма аминокислот и белков, как источника субстратов цикла трикарбоновых кислот и цикла орнитина. Это приводит к значительному накоплению аргинина, являющегося аллостерическим активатором реакций цикла орнитина и накоплению мочевины в качестве низкомолекулярного антиоксиданта. Таким образом, в анадаре формируется низкомолекулярное звено антиоксидантной защиты в виде высокого содержания таких скавенджеров свободных радикалов, как гистидин и мочевина, что может способствовать успеху инвазии этого моллюска в Чёрное и Азовское моря. Рассмотрены вопросы влияния гипоксии на качество моллюсков как сырья для получения БАД.

**Ключевые слова:** *Anadara kagoshimensis*, вид-вселенец, гипоксия, белковый гидролизат, метаболизм аминокислот, Чёрное и Азовское моря

**DOI:** 10.31857/S0044452924010105, **EDN:** ZEZYEK

### ВВЕДЕНИЕ

Интродукция новых биологических видов, зачастую вызванная сбросом балластных вод с судов, является одним из существенных факторов антропогенного воздействия на экосистемы Чёрного и Азовского морей. В XX веке к условиям Чёрного моря адаптировались такие моллюски, как рапана *Rapana venosa*, устрица *Magallana gigas* и анадара *Anadara kagoshimensis*, которые теперь являются объектами промысла и аквакультуры [1]. Первые находки анадары в Чёрном море относятся к 1968 г. [2], затем этот вид был обнаружен

у берегов Болгарии, Румынии и у побережья Турции в 1980–1982 гг., в 1987 проник в северо-западную часть Черного моря, в 1987–1989 проник в Азовское море, а в 1999 г. этот вид был обнаружен на южном побережье Крыма [3]. До 2010 г. этот моллюск имел название *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1789). Однако затем его систематическое положение было уточнено с использованием генетических методов – *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) [4].

Массовое оседание личинок моллюска отмечено на естественных субстратах на глубинах от 3

до 60 м [3, 5], а также на коллекторах морских ферм [6]. Анадара устойчива к гипоксии и аноксии, поскольку обладает эритроцитарным гемоглобином и значительным содержанием каротиноидов [7, 8]. Особенностью адаптации анадары к колебаниям концентрации кислорода в воде является экономное потребление кислорода даже в условиях нормоксии [9–11]. Анадара способна жить в условиях аноксии в 5–6 раз дольше, чем другие виды двустворчатых моллюсков [12], что может быть примером того, как разные виды двустворчатых моллюсков реагируют на стрессовые факторы [13]. В анадаре отмечено высокое содержание водорастворимых скавенджеров радикалов таких, как глутатион, металлотioneины и мочевины [14, 15]. Моллюск обладает мощным комплексом антиоксидантной защиты ферментативной природы [11, 16] и сохраняет устойчивость аденилатного потенциала не только в условиях гипоксии и аноксии, но даже в условиях сероводородного заражения [15, 17].

Этот вид-вселенец имеет конкурентное преимущество перед другими двустворчатыми моллюсками в черноморском бассейне и может создавать новые сообщества на участках с повышенным терригенным накоплением осадков и менее благоприятным кислородным режимом [18]. В настоящее время анадара доминирует в донных сообществах восточного, западного и юго-западного побережья Чёрного моря и может стать перспективным объектом промысла [19, 20]. Скорость роста моллюска в Чёрном море является более высокой по сравнению с другими районами Мирового океана, а по размерам анадара способна достигать показателей, сравнимых с естественными поселениями для аборигенного Индийско-Тихоокеанского региона [21, 22].

Таким образом, большинство работ посвященное адаптациям анадары в Черном и Азовском морях касается наличия ферментативных систем, состава каротиноидов и наличия естественных антиоксидантов у моллюсков. При этом такой класс соединений, как аминокислоты и их роль в адаптационных процессах, практически, выпадает из поля зрения исследователей. Всё это обусловило интерес к исследованию аминокислотного состава анадары, в частности, для биотехнологического направления использования данного объекта потенциальной конхиокультуры.

Цель данной работы — изучить влияние гипоксии на состав свободных аминокислот гемолимфы и гидролизата мягких тканей двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis*, вида-вселенца в Чёрное и Азовское моря. Дополнительной задачей была оценка перспективы использования моллюска в качестве сырья для биологически активных добавок (БАД) и влияние гипоксии на его показатели.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материал

В работе использовали двустворчатого моллюска-вселенца в Чёрное море *Anadara kagoshimensis*. Моллюсков с длиной раковины 25–33 мм содержали в садках на устричной ферме в бухте Карантинная (Крым, г. Севастополь). Моллюсков после изъятия разделяли на контрольную ( $n = 10$ ) и экспериментальную группы ( $n = 5$ ) и помещали в отдельные ёмкости. Контрольную группу животных выдерживали в течение 3 сут в условиях нормоксии —  $5 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ , в экспериментальной — при гипоксии, содержание кислорода поддерживалось на уровне  $0.05\text{--}0.10 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ . Содержание кислорода в воде понижали путем барботажа ее азотом в течение 5 часов. Контроль за содержанием кислорода в воде осуществляли на протяжении всего эксперимента при помощи люминесцентного оксиметра HACH LDO 101. Раз в сутки воду в емкостях, где содержались моллюски, замещали на свежую для удаления метаболитов. Содержание кислорода в воде при этом сохранялось на прежнем уровне. Температура воды поддерживалась на уровне  $16\text{--}17 \text{ }^\circ\text{C}$ . Через 3 сут измеряли индивидуальную массу моллюсков, мягких тканей и раковин. Объём гемолимфы определяли вместе с межстворчатой жидкостью, которая выделяется при вскрытии раковин моллюсков в первые 5 мин. Мягкие ткани использовали для получения гидролизата, а гемолимфу — для выделения аминокислот.

### Лабораторная обработка проб

Свободные аминокислоты (САК) гемолимфы очищали от белковых продуктов, добавляя этанол до конечной концентрации 70% [23]. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 8000 об/мин. Супернатант упаривали при температуре  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  на роторном испарителе ИКА RV10 в вакууме с разряжением от  $-720$  до  $-800$  мбар. Осадок смывали со стенок колбы минимальным объемом раствора соляной кислоты в концентрации  $15 \text{ mM HCl}$ . Гидролиз мягких тканей проводили 1% раствором щелочи в (NaOH, хч) течение 3 ч по методике [24]. Гидролизат упаривали в 2–3 раза по объему при температуре  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  на роторном испарителе под вакуумом от  $-700$  до  $-760$  мбар. Свободные аминокислоты экстрагировали 70% раствором этанола, как и из гемолимфы. Затем пробы повторно центрифугировали и упаривали при тех же условиях, что и образцы гемолимфы, и смывали со стенок колбы минимальным объемом  $15 \text{ mM HCl}$ . Образцы помещали в стерильный флакон объемом  $10 \text{ см}^3$ , запечатывали резиновой пробкой с алюминиевым колпачком и в таком виде отправляли для аминокислотного анализа.

Весовые характеристики определяли гравиметрическим методом, используя аналитические весы AXIS AGN200 (Класс точности по ГОСТ OIML R76-1-2011-1, предел взвешивания (max), кг – 0,2, (min), кг – 0,00001, дискретность, г – 0,001). Данные измерений приведены в работе в граммах и массовых долях.

Содержание сухих веществ определяли, высушивая пробы до постоянного веса при  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  в сушильном шкафу, до разницы в массе между двумя последующими взвешиваниями не более 0,001 г. Определения проводили в 2 повторностях, за окончательный результат принимали среднее арифметическое полученных значений, расхождение результатов не должно превышать 0,5% [23].

Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования (методом Серенсена) [25].

#### Определение аминокислот в пробах

Аминокислотный состав в пробах определяли на аминокислотном анализаторе ARACUS (производства MembraPure, ФРГ) в НИЛ нанобиотехнологии и биофизики СКФУ (Ставрополь, Россия) и НИЛ прикладных проблем биологии БГУ (Минск, Беларусь) с разделением аминокислот на колонке High Resolution длиной 125 мм с использованием буферных систем производителя на основе солей и гидроксида лития, с последующим окрашиванием выходных фракций нингидрином и детектированием на двухканальном матрично-диодном спектрофотометре комплексов нингидрин-аминокислота при длинах волн 570 нм и 440 нм. Идентификацию и количественное содержание аминокислот в пробах выполняли с привлечением программного обеспече-

ния AminoPeak. Данные получали в размерности нМоль, нг/мл и мг/100 мл. Для сопоставления полученных результатов использовали данные по аминокислотному составу гемолимфы и мягких тканей мидии *M. galloprovincialis* и мягких тканей рапаны *R. venosa* [26].

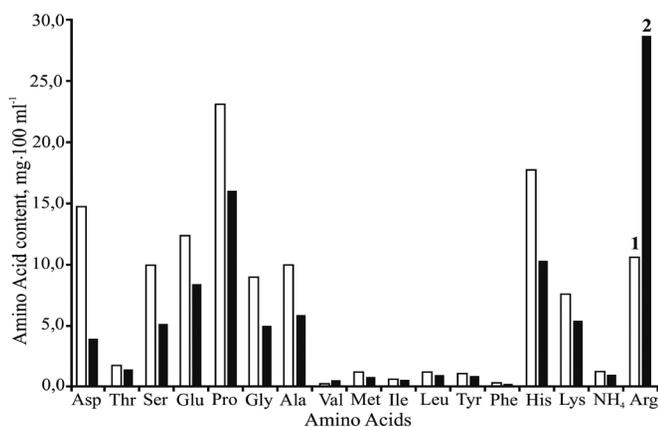
#### Статистический анализ

Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – ошибка среднего. Для исследования нормальности распределения использован критерий Пирсона, рассчитанный в программе Excell (Microsoft Office 2010). Так как выборки не являются равноразмерными, то для выяснения достоверности различий средних значений в двух независимых выборках использовали непараметрический статистический критерий Манна–Уитни [27].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

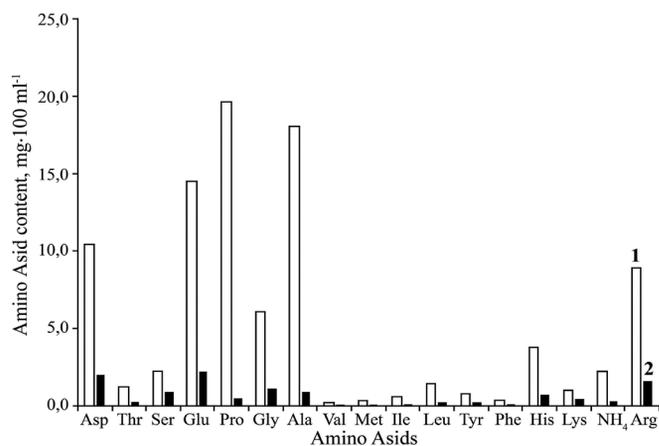
В составе САК гемолимфы и гидролизате мягких тканей анадары идентифицировано 16 протеиногенных аминокислот, однако их содержание варьируется как в зависимости от насыщения воды кислородом, так и от их локализации в организме.

В гемолимфе моллюсков в условиях нормоксии отмечено высокое содержание пролина (23,04 мг/100 мл) и гистидина (17,67 мг/100 мл), аспарагиновой (14,67 мг/100 мл) и глутаминовой (12,29 мг/100 мл) кислот, а также аргинина (10,62 мг/100 мл), что отражено на рис. 1. Под воздействием гипоксии у них резко возрастает концентрация аргинина в гемолимфе (28,56 мг/100 мл) при существенном снижении содержания остальных аминокислот. При этом почти четверо снижается содержание аспарагиновой (3,84 мг/100 мл)



**Рис. 1.** Содержание свободных аминокислот в гемолимфе анадары *Anadara kagoshimensis* при нормоксии (1) и гипоксии (2).

*Примечание.* Глутамин и аспарагин в процессе разделения в кислой среде разлагаются на глутаминовую и аспарагиновую кислоты, поэтому на хроматограмме появляется пик аммиака (см. рис. 1, 2, 3).



**Рис. 2.** Аминокислотный состав гидролизатов мягких тканей *Anadara kagoshimensis* при нормоксии (1) и гипоксии (2).

и в полтора раза глутаминовой (8.27 мг/100 мл) кислот, также существенно уменьшаются концентрации серина, глицина, аланина, пролина, гистидина и лизина (рис. 1).

В гидролизате мягких тканей в условиях нормоксии также отмечено высокое содержание пролина (19.65 мг/100 мл), глутаминовой (14.50 мг/100 мл) и аспарагиновой (10.47 мг/100 мл) кислот, аргинина (8.93 мг/100 мл), а также глицина (6.10 мг/100 мл) и гистидина (3.77 мг/100 мл). Также почти вдвое выше содержание аммиака (2.23 мг/100 мл), что свидетельствует о большем содержании в мягких тканях аспарагина и глутамина, по сравнению с гемолимфой (1.31 мг/100 мл, рис. 2).

Об усиленном катаболизме белков и аминокислот в условиях гипоксии свидетельствует снижение количества свободных аминокислот в гидролизате моллюсков в 2–6 раз, по сравнению с нормальными условиями, для пролина падение составляет в 40 раз, а для метионина, фенилаланина и аланина – от 17 до 19 раз (рис. 2).

Количественные показатели аминокислот в гемолимфе и гидролизате мягких тканей анадары, содержащейся в условиях нормоксии, значительно отличаются от данных, полученных на животных при гипоксии (табл. 1).

Для оценки возможностей использования анадары в качестве БАД и влияния условий выращивания определены весовые характеристики моллюсков и гидролизатов из них, а также содержание аминного азота в гемолимфе и мягких тканях моллюска, данные приведены в табл. 2–4. Соотношение сырой массы створка/мягкие ткани/гемолимфа в условиях нормоксии составляет 57.4:23.9:18.7% (табл. 2). В условиях гипоксии, когда анаэробные процессы катаболизма белков и аминокислот преобладают над синтезом, у анадары изменяется соотношение створка/мягкие ткани/гемолимфа – 67.8:14.2:18.0%. При гипоксии отмечено снижение массы мягких тканей почти вдвое по сравнению

**Таблица 1.** Содержание аминокислот в гемолимфе и гидролизатах мягких тканей *Anadara kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии (в мг на 100 мл)

Аминокислота	Нормоксия		Гипоксия	
	Гемолимфа	Гидролизат	Гемолимфа	Гидролизат
Аспарагиновая кислота	14.67	10.47	3.84	1.98
Треонин	1.68	1.27	1.37	0.29
Серин	9.99	2.23	5.11	0.89
Глутаминовая кислота	12.29	14.50	8.27	2.25
Пролин	23.04	19.65	15.92	0.46
Глицин	8.90	6.10	4.94	1.10
Аланин	9.99	18.04	5.77	0.92
Валин	0.24	0.25	0.45	0.08
Метионин	1.22	0.34	0.72	0.02
Изолейцин	0.61	0.59	0.58	0.12
Лейцин	1.19	1.47	0.90	0.24
Тирозин	1.09	0.83	0.88	0.25
Фенилаланин	0.29	0.35	0.26	0.02
Гистидин	17.67	3.77	10.24	0.74
Лизин	7.55	1.05	5.36	0.45
Аммиак	1.31	2.23	0.97	0.34
Аргинин	10.62	8.93	28.56	1.67
Общее количество	122.35	92.07	94.14	11.82

с контролем (в пересчете на сухой вес – 4.7 и 8.2%, соответственно) (табл. 2). В зависимости от стадии развития и возраста доля мягких тканей может варьировать от 24 до 36% сырой массы моллюска.

Весовые показатели моллюсков и гидролизатов из них приведены в табл. 3. Так, в условиях нормоксии, при соотношении массовых долей створок и мягких тканей в фарше из анадар в пропорции 55.5:44.5% выход гидролизата по содержанию

**Таблица 2.** Весовые показатели анадары *Anadara kagoshimensis* в условиях нормоксии и гипоксии

Образец	Сырая масса, г	Влажность, %	Сухая масса, г	Сырая масса, %	Сухая масса, %
При нормоксии:					
Створка	36.57 ± 0.04	2.7	35.58 ± 0.21	57.4	91.5
Мягкие ткани	15.22 ± 0.47	79.1	3.18 ± 0.08	23.9	8.2
Гемолимфа	11.90 ± 0.28	98.9	0.13 ± 0.01	18.7	0.3
Целиком	63.68	38.9	38.9	100.0	100.0
При гипоксии:					
Створка	21.07 ± 0.04*	2.7	20.50 ± 0.03*	67.8	95.0
Мягкие ткани	4.40 ± 0.02*	76.8	1.02 ± 0.04*	14.2	4.7
Гемолимфа	5.59 ± 0.03*	98.9	0.06 ± 0.02*	18.0	0.3
Целиком	31.06	30.5	21.58	100.0	100.0

*Примечание.* \* – статистически значимые различия по критерию Манна–Уитни  $U < U_{cr}$  ( $U=0$ ,  $U_{cr}=8$ ).  $\chi^2=40.18$  вероятность распределения  $p < 0.001$ ; асимметрия  $A_s = 1.277$ ; эксцесс  $E_x = 0.134$ . Асимметричная форма распределения указывает на отклонение распределения от нормального. В контрольной группе:  $n = 10$ , в экспериментальной:  $n = 5$ .

**Таблица 3.** Весовые показатели фарша и гидролизатов из анадары *Anadara kagoshimensis* в зависимости от условий содержания моллюсков

Образец	Сырая масса, г	Массовая доля от массы фарша, %	Сухая масса, г	Влажность, %	Объем гидролизата, мл	Массовая доля сухих веществ, %
При нормоксии:						
Створка	46.40 ± 0.11	55.5	45.85 ± 0.11	1.2		
Мягкие ткани	37.24 ± 0.10	44.5	7.79 ± 0.02	79.1		
Фарш целиком	83.64	100.0	53.64	35.9	156	4.9
При гипоксии:						
Створка	17.80 ± 0.06*	57.8	17.60 ± 0.06*	1.1		
Мягкие ткани	12.99 ± 0.06*	42.2	2.71 ± 0.01*	79.1		
Фарш целиком	30.79	100.0	20.31	34.0	78	3.9

*Примечание.* \* – статистически значимые различия по критерию Манна–Уитни  $U < U_{cr}$  ( $U=0$ ,  $U_{cr} = 8$ ). В контрольной группе:  $n = 10$ , в экспериментальной:  $n = 5$ .

сухих веществ составил 4.9%. В условиях гипоксии при соотношении массовых долей створок и мягких тканей в фарше из моллюсков 57.8:42.2%, выход составил – 3.9%, соответственно (табл. 3).

Оценка влияния условий гипоксии на накопление аминного азота в гидролизате из анадары приведена в таблице 4. В условиях нормоксии массовая доля аминного азота в гемолимфе моллюска составляет 8.78%, при гипоксии – 6.40% от массы сухого вещества. При нормоксии содержание аминного азота в гидролизате составляет 1.84% от массы сухого вещества, а в условиях гипоксии снижается до 0.34% (табл. 4).

Оценка влияния условий гипоксии на спектр САК в гидролизате из анадары приведена в таблице 5. В состоянии нормоксии соотношение пула

**Таблица 4.** Показатели аминного азота в гемолимфе и гидролизате из анадары *Anadara kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии, в пересчете на массу сухого вещества, в зависимости от условий содержания моллюсков

Образец	Объем, мл	Содержание сухих веществ, г	Массовая доля аминного азота, в %	Концентрация $N_{амин.}$ , г/мл	Содержание $N_{амин.}$ , г
Гемолимфа (нормоксия)	9.4	0.13	8.78	0.0012	0.0115
Гемолимфа (гипоксия)	4.6	0.06	6.40	0.0009	0.0040
Гидролизат (нормоксия)	156	7.79	1.84	0.0009	0.1436
Гидролизат (гипоксия)	78	2.71	0.34	0.0001	0.0092

*Примечание.* \* – В контрольной группе:  $n = 10$ , в экспериментальной:  $n = 5$ .

алифатических, основных и ароматических аминокислот у анадары составило 2:1:0.1, а при гипоксии – 1:1.5:0.2. Отмечено, что при гипоксии происходит перераспределение аминокислотного состава, так пул алифатических аминокислот уменьшается вдвое, при этом вдвое увеличивается содержание ароматических аминокислот и в полтора раза увеличивается содержание основных аминокислот, в основном за счет аргинина (табл. 5).

**Таблица 5.** Содержание свободных аминокислот в гидролизате из анадары *Anadara kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии

Аминокислоты	При нормоксии, %	При гипоксии, %
Пролин	21.35	3.93
Гистидин	4.09	6.27
Нейтральные	3.81	9.98
Дикарбоновые	27.11	16.76
Серосодержащие	0.37	0.20
Алифатические	28.73	20.81
Основные	10.84	17.93
Ароматические	1.28	2.27
$S_{алиф.}/S_{основ.}/S_{ароматич.}$ *	2:1:0.1	1:1.5:0.2

*Примечание.* \* – соотношение суммы аминокислот – алифатические: основные: ароматические. К алифатическим аминокислотам относятся – аланин, валин, глицин, изолейцин и лейцин; к основным – лизин, аргинин; к ароматическим – тирозин, триптофан и фенилаланин.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### *Влияние гипоксии на состав САК гемолимфы*

В составе САК *A. kagoshimensis* отмечено высокое содержание дикарбоновых и основных кислот, что подтверждается аналогичными исследованиями для другого вида анадары *Anadara broughtoni*

[28, 29]. Под воздействием гипоксии в составе аминокислот гемолимфы *A. kagoshimensis* отмечено резкое возрастание концентрации аргинина при существенном снижении содержания остальных аминокислот. При этом снижается содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот почти вдвое, также существенно уменьшаются концентрации серина, глицина и аланина. Отмечены низкие концентрации алифатических аминокислот, метионина и тирозина, практическое отсутствие цистеина и фенилаланина, что характерно и для *A. broughtoni* [29].

Вид *A. kagoshimensis* содержит значительные концентрации гистидина и пролина, в отличие от *A. broughtoni*. Поскольку гистидин выполняет функцию гасителя синглетного молекулярного кислорода, то в гемолимфе моллюска он может использоваться как водорастворимый сквенджер гидроксильного радикала [30]. Кроме того, гистидин входит в молекулу гемоглобина до 10% состава аминокислот [31]. Также гистидин включается в состав гистидиновых дипептидов, участвующих в антиоксидантной системе защиты моллюсков, сходных по строению с карнозином и его производными [32]. Роль пролина в анадаре пока не ясна, однако высокое содержание пролина отмечено также и в мантии другого моллюска — кальмара [28].

Для сравнения с данными, полученными нами ранее [26], приведем содержание массовых долей аминокислот в моллюсках Чёрного моря, обитающих в обычных условиях, и в анадаре (рис. 3). Существенным отличием состава САК гемолимфы анадары от мидии или рапаны является повышенная концентрация пролина и гистидина, содержание которых в анадаре в несколько раз выше, чем

у мидии и рапаны. Также отмечены высокие концентрации аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые также участвуют в процессе катаболизма аминокислот и переносе аммиака из мышечной ткани в гепатопанкреас. Также в анадаре выше содержание основных аминокислот — лизина и аргинина, а также серина (рис. 3). Мидия является богатым источником таурина, алифатических аминокислот — глицина и аланина, серосодержащих аминокислот — цистеина и метионина, а также ароматической аминокислоты — фенилаланина (рис. 3). Рапана отличается высоким содержанием дикарбоновых — аспарагиновой и глутаминовой кислот и основных аминокислот — лизина и аргинина, алифатических аминокислот — валина, лейцина, изолейцина, глицина, ароматических аминокислот — тирозина и фенилаланина, а также метионина, треонина и ГАМК (рис. 3).

Учитывая высокое содержание цитруллина и аргинина [29], увеличение концентрации аргинина почти в три раза при гипоксии может указывать на активизацию цикла орнитина [33], при усилении катаболизма белков и аминокислот, что характерно для моллюсков в условиях гипоксии [34]. Заметим, что у анадары, по сравнению с мидией, накапливается значительное количество мочевины [35].

В наших исследованиях таурин не определяли, однако известно, что это производное метионина составляет в анадаре до 50% от суммы САК [28]. Данное обстоятельство делает анадару перспективным источником для получения БАД, поскольку таурин обладает огромным спектром метаболического действия от детоксикационной функции печени, регуляции кровяного давления, влияния на зрение, до кардиопротективного действия, нейро-

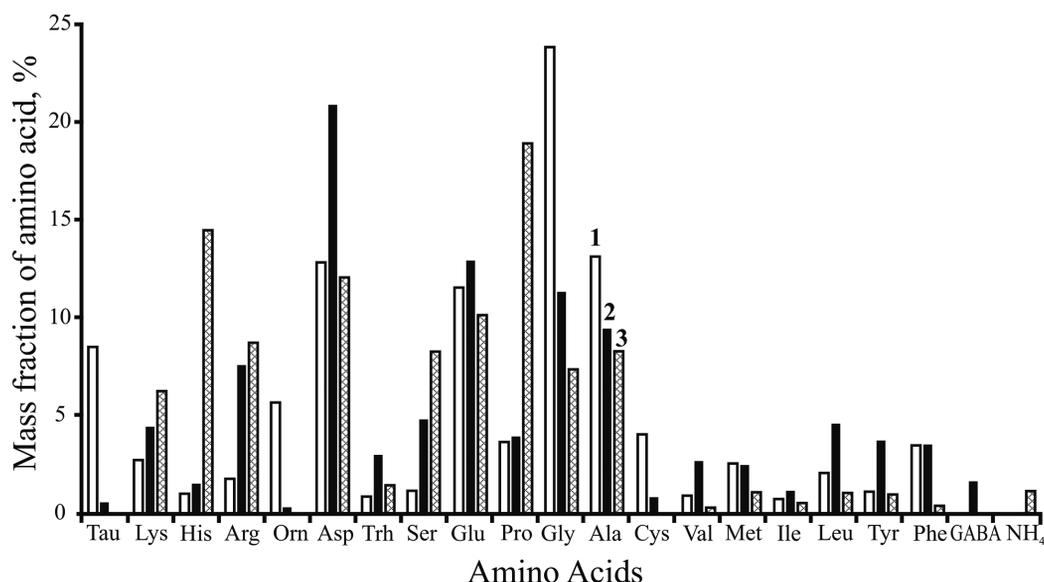


Рис. 3. Содержание свободных аминокислот (массовая доля от общего количества в %) в моллюсках Чёрного моря в условиях нормоксии, где 1 — аминокислоты гемолимфы и мягких тканей мидии *Mytilus galloprovincialis* [26], 2 — аминокислоты мягких тканей рапаны *Rapana venosa* [26], 3 — аминокислоты гемолимфы анадары *Anadara kagoshimensis*.

медиаторной функции и работы головного мозга [36, 37].

Отсутствие цистеина в составе САК анадары, возможно, связано с его активным использованием при синтезе глутатиона, имеющим важное значение в антиоксидантной защите моллюска, о чем свидетельствуют как наличие высокоактивного фермента  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТП, 2.3.2.2) в гепатопанкреасе, так и высокие концентрации глутатиона в ноге [10, 35].

Снижение содержания отдельных видов аминокислот составляет от 2 до 6 раз, что, безусловно, отразится на качестве БАД из гидролизатов и их функциональной и биологической активности, поскольку комплекс САК является антиоксидантом и влияет на иммунитет и другие функции организма человека [39].

Очевидное преобладание в аминокислотном составе анадары по сравнению с мидией и рапаной такого низкомолекулярного скавенджера гидроксильного радикала, как гистидин, и трехкратное возрастание концентрации аргинина, указывает на активизацию цикла орнитина и усиленный синтез такого низкомолекулярного антиоксиданта, как мочевины. Это, безусловно, свидетельствует о наличии мощного низкомолекулярного звена антиоксидантной защиты у анадары, что и позволяет ей выживать в тех условиях, где аборигенные виды уже не могут существовать. Таким образом, можно констатировать, что различия аминокислотного состава анадары и мидии предопределяют успех инвазии анадары в Азово-Черноморский регион в сочетании с отличиями в работе ферментативного звена антиоксидантной защиты.

#### *Влияние гипоксии на состав САК гидролизатов мягких тканей анадары*

Изменения в составе САК подтверждают наши предположения об усилении катаболизма белков в тканях моллюсков. При этом в гемолимфе наблюдается усиление работы цикла орнитина, о чем свидетельствует высокая концентрация аргинина. По-прежнему остаются достаточно высокими концентрации пролина и гистидина (табл. 1). Последний, как известно, является основным низкомолекулярным антиоксидантом и участвует в синтезе гистидиновых дипептидов. Потеря азотистых веществ свидетельствует о негативном воздействии гипоксии на анадару, вынужденном переходе к катаболизму белков и аминокислот для поддержания метаболических процессов за счет использования аминокислот (табл. 4), как субстрата в метаболических путях выработки высокоэнергетических соединений в условиях гипоксии [40]. В этих условиях, когда анаэробные процессы катаболизма белков и аминокислот преобладают над синтезом,

изменяется соотношение створка / мягкие ткани. Так, доля мягких тканей анадары при гипоксии составила менее 60% от содержания мягких тканей в моллюске при нормоксии (см. табл. 2).

Снижение содержания аминного азота и содержания САК в гидролизате мягких тканей от 2 до 6 раз в условиях гипоксии свидетельствует о необходимости контролировать условия обитания анадары, чтобы обеспечить получение гидролизата высокого качества, содержащего сбалансированный набор аминокислот. Таким образом, условия гипоксии, безусловно, оказывают влияние на ценность мяса моллюсков, как пищевого объекта и источника получения биологически активных веществ.

Поэтому необходимо изучать годовую динамику изменения массы тканей и условий культивирования анадары, в том числе проводить контроль концентрации кислорода в воде, поскольку эти показатели будут отражаться на содержании белковых, азотистых и сухих веществ в моллюсках и на качестве гидролизатов из них.

#### *Влияние гипоксии на энергетический обмен*

Аноксия негативно влияет на энергетический статус тканей анадары, что выражается в снижении содержания в них АТФ и АДФ, а также в уменьшении значений аденилатного энергетического заряда (АЭЗ), фосфорильного потенциала (ФП). Известно, что в первые часы острой кислородной недостаточности уровень АТФ и АДФ снижается на 30–50%, при этом АЭЗ снижается до 0.4 единиц. Это связано либо с развитием компенсационных процессов, обеспечивающих аэробный путь, либо с переключением метаболизма на анаэробный путь. При этом данные изменения сохраняются достаточно длительно, что показывает адаптивный характер низкого энергетического статуса анадары [15, 17]. Поэтому можно предположить, что изменения состояния аденилатного пула ткани моллюска функционально достаточны для обеспечения суббазальных скоростей метаболизма. Реальная ситуация, вероятно, регулируется, с одной стороны, потребностью организма анадары в АТФ, с другой, уровнем перекисного окисления липидов (ПОЛ) и концентрацией активных форм кислорода (АФК), и ёмкостью антиоксидантной защиты. Именно катаболизм белков и аминокислот в гепатопанкреасе, по-видимому, обеспечивает в условиях гипоксии субстраты для цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и цикла орнитина, что позволяет моллюску сохранять двигательную активность и гаметогенез на уровне, необходимом для выживания анадары.

Полагаем, что именно сопряжение катаболизма аминокислот и белка с ЦТК и циклом орнитина в митохондриальном матриксе служит осно-

вой метаболической пластичности и устойчивости анадары к стрессовым изменениям концентрации кислорода в среде, которые мы отразили в предполагаемой схеме сопряжения работы этих циклов (оригинальный рис. 4а, б).

Неслучайным выглядит компартиментализация пусковых реакций циклов Кребса и мочевины, катализируемых глутаматдегидрогеназой (ГДГ, 1.4.1.2) глутаматдегидрогеназного комплекса (ГДГК), пируватдегидрогеназным комплексом (ПДГК) и карбамоилфосфатсинтетазой (КМФС, 6.3.4.16) в митохондриальном матриксе. Перенос аммиака через митохондриальную мембрану в виде аланина, катализируемый цитозольным пулом аланинаминотрансферазы (АлАТ, 2.6.1.2), реализуется сразу две задачи – утилизацию аммиака из цитозоля и блокировку восстановления пирувата в лактат, катализируемую лактатдегидрогеназой (ЛДГ, 1.1.1.27), предотвращающей закисление цитозоля [10].

Внутри митохондрии АлАТ катализирует обратную реакцию с переносом  $\text{NH}_2$  группы на  $\alpha$ -кетоглутарат и образованием пирувата, декарбоксилируемого ПДГК с образованием Ацетил-КоА и  $\text{CO}_2$ . Ацетил-КоА запускает ЦТК, где ферменты в ходе дегидрогеназных реакций окисляют ацетат до  $\text{CO}_2$  и вырабатывают АТФ. А глутаматдегидрогеназа ГДГК высвобождает  $\text{NH}_3$  для синтеза карбамоилфосфата и запуска цикла орнитина [41].

Изменения состава САК гемолимфы под действием гипоксии в сторону активного накопления продуктов цикла орнитина – накопления аргинина, который является аллостерическим активатором N-ацетилглутаматсинтазы (2.3.1.1), синтезирующей в митохондриях N-ацетил-глутамат, который является аллостерическим активатором карбамоилфосфатсинтазы (КМФС, 6.3.4.16), ключевого фермента в запуске орнитинового цикла. Известно, что в условиях голодания, когда катаболизм белков усиливается, увеличивается продукция аммиака. При этом индуцируется синтез ферментов цикла орнитина. Поскольку аммиак активно связывает в митохондриях протон водорода и превращается в ион аммония, который не может пройти через митохондриальную мембрану. Это тормозит работу цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), что в условиях гипоксии оказывает губительное действие на продукцию аденозинтрифосфата (АТФ) [41].

В цикле мочевины синтезируются также промежуточные субстраты ЦТК – фумарат, который цитозольной малатдегидрогеназой (МДГ, 1.1.1.37) обращается в малат, который, в свою очередь, переносится из цитозоля в митохондриальный пул малата и окисляется в оксалоацетат [10]. Оксалоацетат может образовываться в цитозоле из гликолитического пути и превращаться фосфоенолпируваткар-

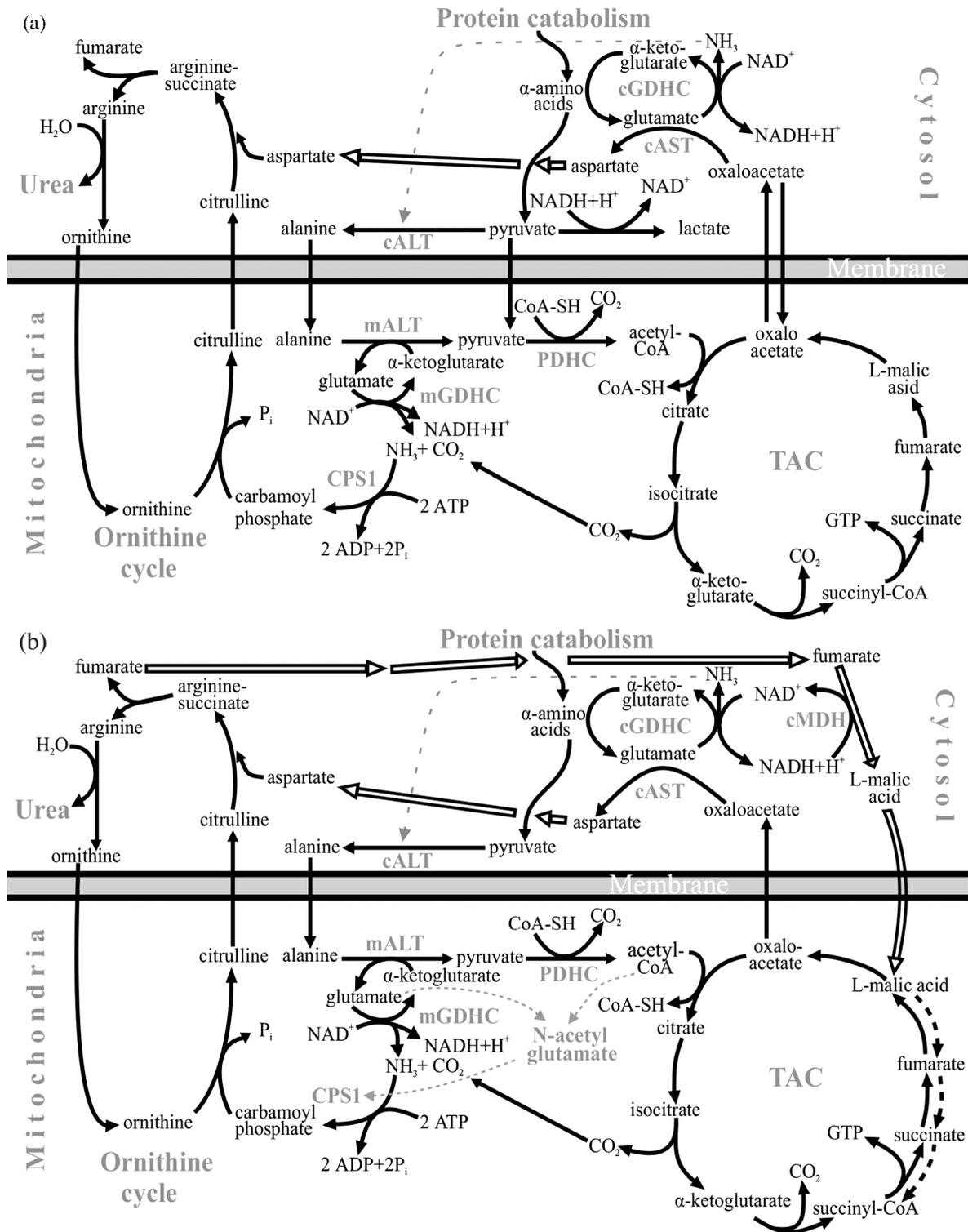
боксилазой (ФЕПКК, 2.7.1.40) из фосфоенолпирувата, что также является ключевым ферментом сопряжения гликолиза с ЦТК и другими анаплеротическими путями [35]. Оксалоацетат может трансминироваться аспаргатаминотрансферазой (АсАТ, 2.6.1.1) в аспаргат, который участвует в образовании аргининсукцината в цикле орнитина.

Такое многоточечное сопряжение катаболизма углеводов, белков с производством АТФ в ЦТК и получением низкомолекулярного антиоксиданта мочевины в цикле орнитина позволяет анадаре легко адаптироваться в условиях гипоксии и даже частично обращать ЦТК в обратном направлении от оксалоацетата до сукцината [35]. При этом не происходит значительной потери в выработке АТФ, что позволяет обеспечить ключевую реакцию цикла орнитина – синтез карбамоилфосфата, требующего 2 молекулы АТФ. При обращении ЦТК от оксалоацетата к сукцинату происходит потеря выработки НАДН и  $\text{H}^+$  на митохондриальной МДГ, а НАДН с глутаматдегидрогеназного комплекса (ГДГК) используется для восстановления ФАД<sup>+</sup> в ФАДН<sub>2</sub>, образовавшегося в результате фумаратдегидрогеназной реакции и производством АТФ. Таким образом, выработка АТФ в условиях гипоксии может снизиться вдвое по сравнению с нормоксией через частичное обращение ЦТК, происходящее через изменения, отраженные в уравнении 2 энергетического баланса по окислению ацетатного двухуглеродного фрагмента (табл. 6).

#### *Взаимосвязь метаболизма аминокислот и энергетического обмена анадары*

Реорганизация тканевого метаболизма на защиту организма от стресса всегда сопровождается кратковременным увеличением количества АФК [42, 43]. Одним из механизмов регуляции повышения уровня АФК выступает синтез мочевины в орнитиновом цикле и направленный на его обеспечение катаболизм белков и аминокислот в гепатопанкреасе анадары [10, 35, 40]. Мочевина выступает в роли низкомолекулярного антиоксиданта, который вступает в реакции с АФК и снижает ПОЛ [14]. Мочевина легко проникает через мембрану эритроцитов и связывается с гемоглобином [44], что приводит к сокращению числа железосодержащих центров ПОЛ и стабилизации мембраны эритроцитов, реализуя тем самым антиоксидантные функции.

Полагаем, что именно сопряжение катаболизма белка и аминокислот с циклом орнитина и ЦТК в митохондриальном матриксе служит основой метаболической пластичности и устойчивости анадары к стрессовым изменениям концентрации кислорода в среде. Компартиментализация пусковых реакций орнитинового цикла, ЦТК и катаболизма



**Рис. 4.** Схема взаимосвязи катаболизма аминокислот с работой цикла Кребса и циклом мочевины. (а) – В условиях нормоксии, (б) – в условиях гипоксии, которые обеспечивают приспособление анадарты *Anadara kagoshimensis* к условиям Черного и Азовского морей (черными стрелками указаны типичные метаболические пути; серым пунктиром – стадии переноса аммиака из цитозоля в митохондрию и в цикл орнитина; двойными стрелками – стадии, сопрягающие работу ЦТК (TAC) и производство макроэнергетических соединений с утилизацией аммиака в цитозоле и синтезом мочевины в цикле орнитина, черные пунктирные – обращенные стадии ЦТК). Использованы следующие обозначения: cGDHC и mGDHC – цитозольный и митохондриальный глутаматдегидрогеназный комплекс, соответственно; cALT и mALT – цитозольный и митохондриальный пул аланинаминотрансферазы; CPS1 – карбамоилфосфатсинтетаза; cAST – цитозольный пул аспаратаминотрансферазы; cMDH – цитозольный пул малатдегидрогеназы; TAC – цикл трикарбоновых кислот (оригинальная схема составлена Голубь Н.А.).

**Таблица 6.** Генерация АТФ в цикле трикарбоновых кислот в сопряжении с циклом мочевины у анадары *A. kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии

Нормоксия	Гипоксия
1. Pyruvate + CoA-SH + NAD <sup>+</sup> → Ac-CoA + N + ADH + H <sup>+</sup> + CO <sub>2</sub> (катализируется ПДГК)	1. Pyruvate + CoA-SH + NAD <sup>+</sup> → Ac-CoA + NADH + H <sup>+</sup> + CO <sub>2</sub> (катализируется ПДГК)
2. Ac-CoA + 3NAD <sup>+</sup> FAD <sup>+</sup> + GDP + P <sub>i</sub> + H <sub>2</sub> O → 2CO <sub>2</sub> + 3NADH + FADH <sub>2</sub> + GTP + 2H <sup>+</sup> + CoA-SH	2. Ac-CoA + 2NAD <sup>+</sup> + FAD <sup>+</sup> + GDP + ADP + 2P <sub>i</sub> + H <sub>2</sub> O → 2CO <sub>2</sub> + NAD <sup>+</sup> + NADH + FADH <sub>2</sub> + GTP + ATP + 2H <sup>+</sup> + CoA-SH
3. GTP + ADP ↔ ATP + GDP	3. GTP + ADP ↔ ATP + GDP
4. 3NADH + FADH <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 0,5O <sub>2</sub> + 12ADP + GTP + 11 P <sub>i</sub> → 12ATP + 3NAD <sup>+</sup> + FAD <sup>+</sup> + GDP + H <sub>2</sub> O	4. NADH + FADH <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 0,5O <sub>2</sub> + 6ADP + GTP + 5 P <sub>i</sub> + ATP → 7 ATP + NAD <sup>+</sup> + FAD <sup>+</sup> + GDP + H <sub>2</sub> O
Суммарно для трех молекул аланина выработка АТФ составляет	
36 ATP + GDP	21 ATP + GDP
5. 3 Glutamate + 3NAD <sup>+</sup> → 3α-ketoglutarate + 3NADH + 3NH <sub>3</sub> + 3H <sup>+</sup>	5. 3 Glutamate + 3NAD <sup>+</sup> → 3α-ketoglutarate + 3NADH + 3NH <sub>3</sub> + 3H <sup>+</sup>
6. 3CO <sub>2</sub> + 3NH <sub>3</sub> + 6ATP → 3 CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> + 6ADP + 6P <sub>i</sub>	6. 3CO <sub>2</sub> + 3NH <sub>3</sub> + 6ATP → 3 CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> + 6ADP + 6P <sub>i</sub>
Итого за вычетом АТФ на цикл орнитина: 36 ATP – 6 ATP = 30 ATP	Итого за вычетом АТФ на цикл орнитина: 21 ATP – 6 ATP = 15 ATP

аминокислот, катализируемых глутаматдегидрогеназой (ГДГ, 1.4.1.2), пируватдегидрогеназным комплексом (ПДГК) и карбамоилфосфатсинтетазой (КМФС, 6.3.4.16) в митохондриальном матриксе предотвращает превращение токсичного аммиака в аммоний-ион, ингибирующий работу ЦТК.

Перенос аммиака через митохондриальную мембрану в виде аланина, катализируемый цитозольным пулом АлАТ (2.6.1.2), реализует сразу две задачи – утилизацию аммиака из цитозоля и блокировку восстановления пирувата в лактат, катализируемую лактатдегидрогеназой (ЛДГ, 1.1.1.27), предотвращающей закисление цитозоля [10]. Поскольку закисление цитозоля приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, набуханию митохондрий, потере целостности мембран и деградации митохондрий, а в целом и к гибели моллюсков. Таким образом, показано физиологическое значение низкомолекулярного звена водорастворимых скавенджеров гистидина, глутатиона и мочевины, которые решают задачу оперативно реагирования и регуляции уровня АФК в тканях анадары.

Наличие не только ферментативного звена в антиоксидантной защите, но и низкомолекулярных водорастворимых скавенджеров типа глутатиона, мочевины и аминокислот, а также значительных концентраций каротиноидов способствуют устойчивому распространению вида-вселенца *A. kagoshimensis* из-за получения существенного преимущества перед местными видами двустворчатых моллюсков [45–47]. Кроме того, этому способствует наличие эритроцитарного гемоглобина [7] и значительное содержание каротиноидов в тка-

нях анадары [45]. Все это в комплексе позволяет анадаре выживать в условиях гипоксии и аноксии до 16 сут, что значительно дольше, по сравнению с другими двустворчатыми моллюсками, в частности, в 5–6 раз дольше, чем мидии [35, 48].

Из-за своих биохимических особенностей анадара легко приспособилась к жизни на шельфе Черного и Азовского морей, особенно подверженном терригенному стоку и заиливанию. Моллюск занимает доминирующее положение в бентосных сообществах, адаптируясь к значительным колебаниям кислорода в среде [19]. Это способно сделать его в ближайшем будущем объектом промысла и конхиокультуры на Чёрном море, что позволит получать из нее БАД и функциональные продукты питания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во вселенце в Чёрное и Азовское моря анадаре *Anadara kagoshimensis* найдены 16 протеиногенных аминокислот. В условиях гипоксии метаболизм моллюска реорганизуется в направлении анаэробного катаболизма белков и аминокислот, как источника получения субстратов для цикла трикарбоновых кислот и цикла орнитина. Это приводит к значительному накоплению субстратов, активирующих последний, в частности аргинина, являющегося аллостерическим активатором реакций цикла орнитина и накоплению мочевины в качестве низкомолекулярного антиоксиданта.

Отмечены высокие концентрации гистидина и пролина в гемолимфе и мягких тканях моллюска. Таким образом, у анадары, по сравнению с миди-

ей, выявлены отличия в аминокислотном составе САК и отмечена стимуляция цикла орнитина в условиях гипоксии, которые позволяют ей оперативнее реагировать на изменения уровня АФК. У анадары более развито низкомолекулярное звено антиоксидантной защиты, что позволяет моллюску успешно осваивать экологические ниши, недоступные аборигенным видам. Условия гипоксии снижают долю мягких тканей анадары в соотношении створка/ мягкие ткани/ гемолимфа почти вдвое по сравнению с нормальными условиями обитания, что приводит к ухудшению показателей гидролизатов по содержанию общего азота (белка), сухих веществ, аминного азота и по составу свободных аминокислот. Такие условия содержания моллюсков могут неблагоприятно влиять на накопление, в частности, свободных аминокислот, что скажется на качестве, получаемых на основе гидролизатов из анадары биологически активных добавок. Физиологические и биохимические особенности метаболизма этого вида-вселенца делают его перспективным объектом промысла и конхиокультуры.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к. б. н. А.В. Бородиной за предоставление моллюсков, находящихся в экспериментальных условиях нормоксии и гипоксии.

У.О. Курзенковой за редакцию рисунков в векторной графике и к. м. н. Е.А. Бочаровой за редакционную правку текста и источников литературы.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (Н.А.Г.), планирование эксперимента и определение задач (Н.А.Г., А.А.С., В.И.Р.), постановка эксперимента (Н.А.Г., А.А.С.), определение аминокислот (В.П.К., Е.В.Б.), обработка данных (Н.А.Г., А.В.К., Е.В.Б.), написание и редактирование манускрипта (Н.А.Г., А.А.С., В.И.Р., А.В.К., В.П.К., Е.В.Б.)

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по темам госзадания ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0 и № 121041400077-1.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Katsanevakis S, Gatto F, Zenetos A, Cardoso AC* (2013) How many marine aliens in Europe? *Management Biol Invas* 4(1):37–42. <https://doi.org/10.3391/mbi.2013.4.1.05>
2. *Киселева МИ* (1992) Сравнительная характеристика донных сообществ у берегов Кавказа. / Заика ВЕ, Киселева МИ, Михайлова ТВ и др. Многолетние изменения зообентоса Черного моря. Киев: Наук. думка. 84–99. [*Kiseleva MI* (1992) Comparative characteristics of bottom communities off the coast of the Caucasus. Long-term changes of the Black Sea zoobenthos. Kiev. Nauk. Dumka. 84–99. (In Russ)].
3. *Анистратенко ВВ, Халиман ИА* (2006) Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalis* (Bivalvia, Arcidae) в северной части Азовского моря: завершение колонизации Азово-Черноморского бассейна. *Вестник зоологии* 40(6):505–511. [*Anistratenko VV, Haliman IA* (2006) Bivalve mollusc *Anadara inaequalis* (Bivalvia, Arcidae) in the Northern Part of the Sea of Azov: Completion of Colonization of the Azov-Black Sea Basin. *Vestnik zoologii* 40(6):505–511. (In Russ)].
4. *Krapal AM, Popa OP, Levarda AF, Iorgu EI, Costache M, Crocetta F, Popa LO* (2014) Molecular confirmation on the presence of *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Mollusca: Bivalvia: Arcidae) in the Black Sea. *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"* 57(1):9–12. <https://doi.org/10.2478/travmu-2014-0001>
5. *Sahin C, Emiral H, Okumus I, Mutlu Gozler A* (2009) The Benthic Exotic Species of the Black Sea: Blood Cockle (*Anadara inaequalis*, Bruguiere, 1789: Bivalve) and Rapa Whelk (*Rapana thomasiana*, Crosse, 1861: Mollusc). *J Anim Veterin Adv* 8(2):240–245.
6. *Вялова ОЮ* (2011) Современное состояние зооресурсов бентали Азово-Черноморского бассейна. Ростовые, морфометрические и биохимические характеристики анадары *Anadara inaequalis* в Чёрном море (акватория Голубого Залива, ЮБК) / Болтачев АР, Зуев ГВ, Чесалин МВ и др. Промысловые биоресурсы Черного и Азовского морей. ЭКОСИ-Гидрофизика. 189–192. [*Vjalova OJu* (2011) The current state of bentali zoological resources of the Azov-Black Sea basin. Growth, morphometric and biochemical characteristics of *Anadara inaequalis* in the Black Sea (Blue Gulf area, SCK). Sevastopol'. *JeKOSI-Gidrofizika*. 189–192 (In Russ)].
7. *Новицкая ВН, Солдатов АА* (2011) Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики. *Морський екологічний журнал* 10(1):56–64. [*Novickaja VN, Soldatov AA* (2011) Erythroid elements of hemolymph in *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) under conditions of experimental anoxia: functional and morphometric characteristics. *Morsk ekol zhurn* 10(1):56–64. (In Russ)].
8. *Borodina AV, Soldatov AA* (2019) The Effect of Anoxia on the Content and Composition of Carotenoids in the

- Tissues of the Bivalve Invader *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Russ J Biol Invas* 10(4): 307–314. <https://doi.org/10.1134/S2075111719040027>
9. Soldatov AA, Andreenko TI, Golovina IV, Stolbov AY (2010) Peculiarities of organization of tissue metabolism in mollusks with different tolerance to external hypoxia. *J Evol Biochem Physiol* 46(4): 341–349. <https://doi.org/10.1134/S0022093010040022>
  10. Golovina IV, Gostyukhina OL, Andreyenko TI (2016) Specific Metabolic Features in Tissues of the Ark Clam *Anadara kagoshimensis* Tokunaga, 1906 (Bivalvia: Arcidae), a Black Sea Invader. *Russ J Biol Invas* 7(2): 137–145.
  11. Gostyukhina OL, Andreenko TI (2020) Superoxide dismutase and catalase activities in tissues of the Black Sea bivalve mollusks *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789), *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) and *Mytilus galloprovincialis* Lam. as related to adaptation to their habitats. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology* 56(2):113–124. <https://doi.org/10.1134/S0022093020020039>
  12. de Zwaan A, Babarro JMF, Monari M, Cattani O (2002) Anoxic survival potential of bivalves: (arte)facts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A – Molecular and Integrative Physiology* 131(3):615–624. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(01\)00513-x](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(01)00513-x)
  13. Yao C, Somero GN (2013) Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: Cell cycle regulation and DNA repair. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and integrative physiology* 165(2):159–168. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.024>
  14. Чеснокова НП, Понукалина ЕВ, Бизенкова МН (2006) Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах. *Успехи современного естествознания* 7:29–36. [Chesnokova NP, Ponukalina EV, Bizenkova MN (2006) Molekuljarno-kletochnye mehanizmy inaktivacii svobodnyh radikalov v biologicheskix sistemah [Molecular and cellular mechanisms of free radical inactivation in biological systems]. *Uspexi sovremennogo estestvoznaniya* 7:29–36. (In Russ)].
  15. Soldatov AA, Sysoeva IV, Sysoev AA, Andreenko TI (2010) Adenylate system of tissues of the bivalve mollusk *Anadara inaequivalvis* under experimental anoxia. *Hydrobiol J* 46: 60–67. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v46.i5.70>
  16. Golovina IV. (2019) Resistance to negative effects and the ratio of energy metabolism enzyme activity in tissues of the Black Sea molluscs *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 and *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Marine Biol J* 4(3): 37–47. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.3.04>
  17. Soldatov AA, Golovina IV, Kolesnikova EE, Sysoeva IV, Sysoev AA (2022) Effect of Hydrogen Sulfide Loading on the Activity of Energy Metabolism Enzymes and the Adenylate System in Tissues of the *Anadara kagoshimensis* Clam. *Inland Water Biol* 15(5): 632–640. <https://doi.org/10.1134/S1995082922050194>
  18. Revkov NK (2016) Colonization's features of the Black Sea basin by recent invader *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae). *Marine Biol J* 1(2): 3–17. <https://doi.org/10.21072/MBJ.2016.01.2.01>
  19. Ревков НК, Щербань СА (2017) Особенности биологии двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* в Черном море. *Экосистемы* 9(39): 47–56. [Revkov NK, Shherban' SA (2017) The biology of the bivalve *Anadara kagoshimensis* in the Black sea. *Jekosistemy* 9(39): 47–56. (In Russ)].
  20. Dağtekin M, Dalgıç G, Erbay M, Akpınar İÖ, Aydın M, Özdemir S, Cebeci A, Karayücel S (2023) Population abundance and growth parameters of an exotic bivalve species, *Anadara kagoshimensis*, in the Southwestern Black Sea. *Turkish J Zool* 47(1): 3. <https://doi.org/10.55730/1300-0179.3109>
  21. Acarli S, Lok A, Yigitkurt S (2012) Growth and survival of *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) in Sufa Lagoon, Izmir, Turkey. *Israeli J Aquacult – Bamidgeh* 64. <https://doi.org/10.46989/001c.20623>
  22. Anistratenko VV, Anistratenko OYu, Khaliman IA (2014) Conchological variability of *Anadara inaequivalvis* (Bivalvia, Arcidae) in the Black-Azov Sea basin. *Vestnik Zool* 48(5): 457–466. <https://doi.org/10.2478/vzoo-2014-0054>
  23. Романкевич ЕА (ред) (1980) Методы исследования органического вещества в океане. Сборник статей АН СССР, Институт океанологии им. П.П. Ширшова. М. Наука 342 с. [Romankevich EA (red) (1980) Methods of investigation of organic matter in the ocean. Sbornik statej AN SSSR, Institut okeanologii im. P.P. Shirshova. M. Nauka 342 s. (In Russ)].
  24. Голубь НА, Ерохин ВЕ, Солоницына ОР (2005) Исследование химического состава щелочного мидийного гидролизата. *Морські біотехнічні системи. Збірник наукових статей НДЦ ЗС України “Державний океанаріум”* 3:23–29. [Golub' NA, Erohin VE, Solonicyyna OR (2005) Investigation of the chemical composition of alkaline mussel hydrolysate. *Mors'ki biotekhnichni sistemi. Zbirnik naukovih statej NDC ZS Ukraïny “Derzhavnij okeanarium”* 3:23–29. (In Russ)].
  25. Збарский БИ (1954) Определение азота аминных групп методом формольного титрования / Збарский БИ, Збарский ИБ, Солнцев АИ Практикум по биологической химии. М: Медгиз, 37–38 [Zbarskij BI (1954) Opredelenie azota aminnyh grupp metodom formol'nogo titrovaniya/ Zbarskij BI, Zbarskij IB, Solncev AI Praktikum po biologicheskoi khimii [Workshop on biological chemistry]. М: Medgiz 37–38].
  26. Голубь НА, Ерохин ВЕ, Рябушко ВИ (2015) Биотехнология получения продукта лечебно-профилактического назначения из двустворчатого моллюска мидии. *Вестн биотехнол физико-хим биол им. Ю.А. Овчинникова* 11(2): 11–19. [Golub' NA, Erohin VE, Rjabushko VI (2015) Biotechnology of obtaining the product of therapeutic and prophylactic appointment from the bivalve mussels. *Vest Biotekhnol FIZiko-Himichesk Biol im. Ju.A. Ovchinnikova* 11(2):11–19. (In Russ)].
  27. Гланц С (1998) Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М., Практика. 459 с. [Glantz S (1998) Ме-

- diko-biologicheskaya statistika [Primer of biostatistics]. Per. s angl. M., Praktika, 1998. 459 s. (In Russ)].
28. *Пивненко ТН, Ковалёв НН, Запорожец ТС, Беседнова НН, Кузнецова ТА* (2015) Ферментативные гидролизаты из гидробионтов Тихого океана как основа для создания биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания. Владивосток. Дальнаука 160 с. [*Pivnenko TN, Kovaljov NN, Zaporozhec TS, Besednova NN, Kuznesova TA* (2015) Enzymatic hydrolysates from hydrobionts of the Pacific Ocean as a basis for the creation of biologically active food supplements and functional food products. Vladivostok. Dal'nauka 160 s. (In Russ)].
  29. *Табакеева ОВ, Табакаев АВ* (2016) Оценка двустворчатого моллюска *Anadara Brotona* как источника белка и минеральных элементов в питании человека. Пищ промышленность 8: 58–61. [*Tabakaeva OV, Tabakaev AV* (2016) Assessment of bivalve mollusk of *Anadara broughtoni* as a source of protein and minerals in human nutrition. Pishh Promyshl 8: 58–61. (In Russ)].
  30. *Mizukawa H, Okabe E* (1997) Inhibition by singlet molecular oxygen of the vascular reactivity in rabbit mesenteric artery. British J Pharmacol 121(1): 63–70. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701103>.
  31. *Хлыбова СВ, Циркин ВИ* (2006) Свободный L-гистидин как один из регуляторов физиологических процессов. Вятский мед вестн 3–4. [*Hlybova SV, Cirkin VI* (2006) Free L-histidine as one of the regulators of physiological processes. Vjatskij Med Vestn 3–4. (In Russ)].
  32. *Табакеева ОВ, Черных АГ* (2013) Антиоксидантные свойства продуктов переработки двустворчатых моллюсков Дальневосточного региона. Пищевая промышленность. 9:34–36. [*Tabakaeva OV, Chernyh AG* (2013) Antioxidant properties of products of processing of bivalve mollusks of the Far East region. Pishh promyshl 9: 34–36. (In Russ)].
  33. *Kuvaeva ZI, Lopatik DV, Markovich MM et al.* (2012) Synthesis of L-ornithine L-aspartate from L-arginine. Pharmaceutical Chem J 46(8): 495–497. <https://doi.org/10.1007/s11094-012-0833-x>
  34. *Фокина НН, Неведова ЗА, Немова НН* (2011) Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (Обзор). Труды Карельского Научного Центра Российской Академии Наук 3:121–130. [*Fokina NN, Nefedova ZA, Nemova NN* (2011) Biochemical adaptations of marine bivalves to anoxic conditions (Review)]. Trudy Karel'skogo Nauchnogo Centra Rossijskoj Akademii Nauk 3:121–130. (In Russ)].
  35. *Солдатов АА, Андреенко ТИ, Головина ИВ* (2008) Особенности организации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequivalvis* Bruguiere. Доклады Национальной Академии Наук Украины 4:161–165. [*Soldatov AA, Andreenko TI, Golovina IV* (2008) Peculiarities of the organization of tissue metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* Bruguiere. Doklady Nacional'noj Akademii Nauk Ukrainy 4:161–165. (In Russ)].
  36. *Аюшин НБ* (2001) Таурин: фармацевтические свойства и перспективы получения из морских организмов. Известия ТИНРО 129: 129–145. [*Ajushin NB* (2001) Taurine: pharmaceutical properties and prospects for obtaining from marine organisms. Izvestija TINRO 129: 129–145. (In Russ)].
  37. *Басалай ОН, Радковец АЮ, Бушма МИ* (2017) Таурин: регулятор метаболизма и лекарственное средство. Медицинские новости 5: 3–7. [*Basalaj ON, Radkovec AJu, Bushma MI* (2017) Taurine: the metabolic regulator and the drug. Medicinskie novosti 5: 3–7].
  38. *Гостюхина ОЛ, Головина ИВ* (2012) Особенности системы антиоксидантной защиты черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara inaequivalvis* Br. Український біохімічний журнал 84(3): 31–36. [*Gostjuhina OL, Golovina IV* (2012) Peculiarities of antioxidant defense system organization of the Black sea mollusks *Mytilus galloprovincialis* Lam. and *Anadara inaequivalvis* Br. Ukrain's'kij biohimichnij zhurnal 84(3): 31–36. (In Russ)].
  39. *Давидович ВВ, Пивненко ТН* (2001) Аминокислоты двустворчатых моллюсков: биологическая роль и применение в качестве БАД. Известия ТИНРО 129: 146–153. [*Davidovich VV, Pivnenko TN* (2001) Amino acids of bivalve molluscs: biological role and use as a dietary supplement. Izvestija TINRO 129: 146–153. (In Russ)].
  40. *Андреенко ТИ, Солдатов АА, Головина ИВ* (2009) Особенности реорганизации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) в условиях экспериментального голодания. Морской экологический журнал 8(3): 15–24. [*Andreenko TI, Soldatov AA, Golovina IV* (2009) Characteristics of tissue metabolism reorganization in bivalve mollusk *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) under experimental starvation conditions. Morskoy ekologicheskij zhurnal 8(3): 15–24. (In Russ)].
  41. *Ленинджер А* (1985) Основы биохимии / В 3-х т. 2. Пер. с англ. М. Мир 368 с. [*Leninzher A* (1985) Osnovy biohimii [Principles]/ V 3-h t. 2. Per. s angl. M. Mir 368 s. (In Russ)].
  42. *Истомина АА, Довженко НВ, Челомин ВП* (2011) Реакция антиоксидантной системы на аноксию и реоксигенацию у морского двустворчатого моллюска *Scapharca broughtoni*. Вестн Моск гос обл универс 3: 12–16. [*Istomina AA, Dovzhenko NV, Chelomin VP* (2011) Antioxidant Defenses During Anoxia And Aerobic Recovery In Marine Bivalvia *Scapharca Broughtoni*. Vestn Mosk Gos Obl Univer 3:12–16. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18384/2224-0209-2011-3-440>
  43. *Карбышев МС, Абдуллаев ШП* (2018) Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие. ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России. Москва. Издательство ХХ 60 с. [*Karbyshhev MS, Abdullaev ShP* (2018) Biohimija oksidativnogo stressa: uchebno-metodicheskoe posobie. FGBOU VO RNIMU imeni N.I. Pirogova Minzdrava Rossii. Moskva. Izdatel'stvo HH 60 s.].
  44. *Кения МВ, Лукаш АИ, Гуськов ЕП* (1993) Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе. Успехи современной биологии 113(4): 456–470. [*Kenija MV, Lukash AI, Gus'kov EP* (1993) Rol' nizkomolekuljarnyh antioksidantov pri okislitel'nom stressе. Uspеhi sovremennoj biologii 113(4): 456–470. (In Russ)].

45. Soldatov AA, Gostyukhina OL, Borodina AV, Golovina IV (2013) Qualitative composition of carotenoids, catalase and superoxide dismutase activities in tissues of the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* (Bruguere, 1789). *J Evol Biochem Physiol* 49(4): 255–263. <https://doi.org/255–63>. 10.1134/S0022093013040026
46. Soldatov AA, Gostyukhina OL, Borodina AV, Golovina IV (2017) Glutathione Antioxidant Complex and Carotenoid Composition in Tissues of the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *J Evol Biochem Physiol* 53: 289–297. <https://doi.org/10.1134/S0022093017040056>
47. Gostjuhina OL, Andreenko TI (2020) Enzymatic and Low-Molecular Weight Parts of Antioxidant Complex in Two Species of Black Sea Mollusks with Different Resistance to Oxidative Stress: *Mytilus galloprovincialis* Lam. and *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Biol Bull Rev* 10: 38–47. <https://doi.org/10.1134/S2079086420010041>
48. Nakano T, Yamada K, Okamura K (2017) Duration rather than frequency of anoxia causes mass mortality in ark shell *Anadara kagoshimensis*. *Marine Poll Bull* 125(1–2): 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.073>

## EFFECT OF HYPOXIA ON AMINO ACID CONTENT IN HAEMOLYMPH AND PROTEIN HYDROLYSATE OF THE BIVALVE MOLLUSK *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

N. A. Golub <sup>a,#</sup>, A. A. Soldatov <sup>a</sup>, V. I. Ryabushko <sup>a</sup>, A. V. Kuznetsov <sup>a</sup>,  
V. P. Kurchenko <sup>b</sup>, and E. V. Budkevich <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS, Sevastopol, Russia

<sup>b</sup> Belarusian State University, Minsk, Belarus

<sup>c</sup> North Caucasian Federal University, Stavropol, Russia

<sup>#</sup> e-mail: \*ngolub66@gmail.com

*Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) is a bivalve alien species of the Black Sea and of the Azov Sea. The amino acid composition of hemolymph and protein hydrolysates of the mollusc soft tissues was studied. The content of 16 proteinogenic amino acids in the samples was determined by ion-exchange chromatography followed by ninhydrin detection. High concentrations of histidine and proline were observed in the hemolymph and soft tissues of the mollusc. Experimental hypoxia revealed qualitative and quantitative changes in the content of free amino acids in both hemolymph and soft tissue hydrolysates. In particular, the pool of aliphatic amino acids decreased twice and the pool of aromatic amino acids increased. The mass fraction of soft tissues almost halved under hypoxia, compared to normal conditions, which corresponded to 4.7% in the experiment and 8.2% in the control. This leads to a deterioration of the hydrolysates in total and amine nitrogen as well as in dry matter (0.34 and 1.84% of dry matter in hypoxia and normoxia). It has been shown that the metabolism of molluscs is reorganized under hypoxic conditions towards anaerobic catabolism of amino acids and proteins as a source of substrates for the citric acid and ornithine cycles. This leads to a significant accumulation of arginine, which is an allosteric activator of ornithine cycle reactions, and an accumulation of urea, which is a low-molecular-weight antioxidant. Thus, a low-molecular-weight part of the antioxidant defense system in the form of a high content of free radical scavengers like histidine and urea is formed in *A. kagoshimensis*, which may contribute to the success of the invasion of this mollusc in the Black Sea and of the Azov Sea. The issues of the influence of hypoxia on the quality of shellfish as raw materials for obtaining dietary supplements are considered.

**Keywords:** *Anadara kagoshimensis*, alien species, hypoxia, protein hydrolysate, amino acid metabolism, Black Sea, Azov Sea