

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр  
«Институт биологии южных морей  
имени А. О. Ковалевского РАН»

*на правах рукописи*

**Капранова Лариса Леонидовна**

**ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДВУСТВОРЧАТОГО  
МОЛЛЮСКА *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819  
В ПЕРИОД РАЗМНОЖЕНИЯ**

1.5.16. Гидробиология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник,  
Рябушко Виталий Иванович

Научный консультант:

кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник  
Нехорошев Михаил Валентинович

Севастополь – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1 СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ И ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)</b> .....	11
<b>ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	37
2.1 Объект исследований .....	37
2.2 Определение общего тестостерона и эстрадиола в гонадах и половых продуктах мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	38
2.3 Определение ЖК-состава гонад и половых продуктов мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	42
2.4 Определение элементного состава гонад, половых продуктов и личинок мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	44
2.5 Определение хлорорганических соединений в мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i> и ее личинках.....	49
2.6 Статистическая обработка результатов .....	52
<b>ГЛАВА 3 СОДЕРЖАНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В МИДИИ MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</b> .....	54
3.1 Общий тестостерон и эстрадиол в гонадах и половых продуктах мидий на разных стадиях репродуктивного цикла .....	54
3.2 Экскреция тестостерона и эстрадиола вместе с половыми продуктами .....	61
<b>ГЛАВА 4 СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ГОНАД, ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛИЧИНОК МИДИИ MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</b> .....	70
4.1 Состав жирных кислот половых продуктов и гонад мидий .....	70
4.2 Содержание хлорорганических соединений в гонадах и половых продуктах мидий .....	80

4.3 Состав жирных кислот трохофор мидий, выращенных в условиях загрязненности полихлорбифенилами .....	85
<b>ГЛАВА 5 СОДЕРЖАНИЕ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В МИДИИ MYTILUS GALLOPROVINCIALIS.....</b>	<b>98</b>
5.1 Элементный состав гонад, половых продуктов и трохофор черных и коричневых цветковых морф мидий .....	98
5.2 Экскреция элементов вместе с половыми продуктами мидий .....	113
<b>ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ГОНАД И ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ МИДИИ MYTILUS GALLOPROVINCIALIS.....</b>	<b>124</b>
6.1 Способ получения биологически активных веществ и эмбриональных тотипотентных клеток из гонад и половых продуктов мидий .....	125
6.2 Способ получения функционального продукта из мидий .....	132
6.3 Способ получения из мидий масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами .....	133
6.4 Способ получения из гонад мидий вещества, обладающего противоопухолевой активностью .....	138
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>142</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>146</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>148</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>150</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** В условиях развития конхиокультуры комплексные исследования выращиваемых моллюсков, в т. ч. изучение процессов роста и репродукции с применением разнообразных эколого-биохимических показателей, являются важной задачей гидробиологии, морской биохимии и биотехнологии (Benniona, 2019). При изучении размножения двустворчатых моллюсков необходимо, в первую очередь, учитывать состояние гонад на разных стадиях репродуктивного цикла. Тестостерон, эстрадиол, жирные кислоты макро- и микроэлементы, в частности селен (Se) и цинк (Zn), обладая высокой физиологической активностью, принимают непосредственное участие в размножении моллюсков (Lowe et al., 1979; Falchuk et al., 2001; Ahsan et al., 2014). Исследование содержания этих веществ в гонадах на разных стадиях репродуктивного цикла и в половых продуктах (ПП) мидий является одним из важных направлений биохимических исследований. При изучении экологической составляющей процесса размножения необходимо принимать во внимание механизмы взаимоотношения моллюсков и среды обитания, например, влияние хлорорганических соединений (ХОС) на состав жирных кислот (ЖК-состав) мидий, способных аккумулировать гидрофобные ХОС (Stange et al., 1994; Perugini et al., 2004), а также конъюгировать стероидные гормоны (Scott, 2018). Накопление ХОС в гонадах мидий на разных стадиях репродуктивного цикла и влияние ХОС на ЖК-состав личинок (трохофор) до настоящего времени не были исследованы. Недостаточная изученность эколого-биохимических аспектов размножения мидии *M. galloprovincialis*, обитающей в Чёрном море, с учетом влияния факторов загрязнения окружающей среды определяет актуальность диссертационной работы. Полученные данные также представляют практический интерес для совершенствования биотехнологии воспроизводства морских гидробионтов и получения функциональных продуктов на их основе.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время имеются данные о содержании стероидных гормонов в тканях самцов и самок

мидий в зависимости от сезона года (Janer, 2006). Ряд работ посвящен изучению ЖК-состава моллюсков (Besnard et al., 1989; Conquer et al., 1999; Berge, Barnathan, 2005; Dridi et al., 2007). Однако до сих пор не определено содержание половых гормонов в гонадах мидий на разных стадиях репродуктивного цикла и в ПП. Отсутствует информация о ЖК-составе личинок и сперматозоидов мидий, а также о динамике содержания ЖК в гонадах в зависимости от стадии репродуктивного цикла. Не установлено влияние ХОС на ЖК-состав. Отсутствуют сведения о накоплении макро- и микроэлементов в гонадах мидий, отличающихся по цвету раковин, на протяжении репродуктивного цикла, включая ПП и личинки. Не рассмотрены процессы экскреции биологически активных веществ (БАВ) и микроэлементов вместе с ПП. Также не разработаны технологии получения функциональных продуктов на основе гонад и ПП мидии *M. galloprovincialis*.

**Цель работы** — изучение эколого-биохимических характеристик мидии *M. galloprovincialis* из Чёрного моря в период размножения в природных условиях и при загрязненности ХОС. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить концентрации общего тестостерона и эстрадиола в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах мидий на разных стадиях репродуктивного цикла;
2. Исследовать состав жирных кислот и динамику изменения их концентраций в зависимости от стадии репродуктивного цикла в гонадах, ПП и личинках (трохофорах) мидий;
3. Оценить степень аккумуляции ХОС в гонадах и ПП мидий, а также установить влияние ХОС на ЖК-состав трохофор;
4. Определить концентрации макро- и микроэлементов в гонадах, и личинках мидий с черной и коричневой окраской раковин;
5. Рассчитать экскрецию тестостерона, эстрадиола, Se и Zn культивируемыми мидиями;
6. Разработать новые технологии получения биологически активных веществ из мидии и продуктов на их основе.

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное исследование содержания тестостерона, эстрадиола, ЖК, макро- и микроэлементов в гонадах на разных стадиях репродуктивного цикла, в ПП и личинках мидии *M. galloprovincialis*. Показано, что содержание стероидных гормонов в моллюсках зависит от их половой принадлежности, стадии репродуктивного цикла и соответствует сезонному циклу размножения. Максимальная концентрация тестостерона обнаружена в сперматозоидах, эстрадиола — в гонадах самок на 3 стадии репродуктивного цикла. Состав ЖК гонад также зависит от стадии репродуктивного цикла мидий. МНЖК и ПНЖК преобладают в гонадах самцов и в ПП. В сперматозоидах их суммарное содержание выше, чем в гонадах самок и яйцеклетках. Относительное содержание НЖК в яйцеклетках выше, чем в сперматозоидах, а в гонадах самок выше, чем у самцов. Впервые определено влияние нереста мидий на изменение уровня загрязненности ХОС гонад и ПП. В гонадах коллекторных мидий, яйцеклетках и сперматозоидах обнаружены пять конгенов ПХБ, ДДТ и его метаболитов. Вымет половых продуктов уменьшает содержание ХОС в гонадах вследствие передачи ХОС в яйцеклетки и сперматозоиды, и с ними — в морскую среду. ЖК-состав личинок мидий в значительной мере зависит от степени загрязненности среды их обитания ПХБ. Различия в элементном составе коричневой и черной цветовой морф мидий наиболее заметны в ПП и трохофорах. Тестостерон, эстрадиол, ЖК, макро- и микроэлементы экскретируются во время нереста в водную среду вместе с половыми продуктами.

**Теоретическая значимость.** Теоретическая значимость работы заключается в исследовании динамики концентраций стероидных гормонов и жирных кислот в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах мидий, что говорит о необходимости потребления моллюсками из окружающей среды не только жирных кислот, но и стероидных гормонов. В результате проделанной работы была показана связь между содержанием жирных кислот, половых стероидов и микроэлементов в гонадах (в зависимости от стадии репродуктивного цикла), яйцеклетках и сперматозоидах. В гонадах самцов мидий к концу репродуктивного

цикла отмечено уменьшение концентрации тестостерона и увеличение — на начальных стадиях репродуктивного цикла и перед нерестом. В сперматозоидах в пересчете на сухую массу содержание общего тестостерона выше, чем в гонадах, что согласуется с характером конъюгации тестостерона с жирными кислотами, когда перед нерестом повышается доля свободного экзогенного тестостерона, а в середине цикла, находясь в связанном состоянии с ЖК, концентрация тестостерона практически не меняется. Максимальная концентрация эстрадиола в гонадах самок, наоборот, отмечена в середине репродуктивного цикла, что определяет природу эстрадиола. Эти факты свидетельствуют о роли стероидных гормонов и ЖК в регуляции гаметогенеза вне зависимости от их происхождения в организме. На примере селена впервые удалось показать взаимосвязь элементного состава гонад на разных стадиях репродуктивного цикла с концентрацией тестостерона, что подтверждает экзогенное происхождения стероидов, ЖК, макро- и микроэлементов в организме мидий. На примере ХОС показан характер биоаккумуляции токсикантов и их влияние на ЖК-состав гонад, ПП и трохофор моллюсков. Вымет ПП уменьшает содержание ХОС в гонадах мидий вследствие передачи ХОС в яйцеклетки и сперматозоиды.

**Практическая значимость.** Разработаны новые технологии получения биологически активных веществ из гонад, половых продуктов и эмбриональных тотипотентных стволовых клеток мидии *M. galloprovincialis*: получение биологически активного вещества для поддержания общего физиологического статуса человека; разработка функционального продукта на основе эмбриональных тотипотентных стволовых клеток; создание масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами; получение из гонад мидий вещества, обладающего противоопухолевой активностью.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Исследования выполнены в рамках Госзадания ФИЦ ИнБЮМ по темам: «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически

активных веществ и технических продуктов морского генезиса» № 121030300149–0; «Фундаментальные исследования популяционной биологии морских животных, их морфологического и генетического разнообразия» № 121040500247–0; «Молисмологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем» № 121031500515–8.

**Методы исследований.** Концентрацию стероидов в пробах определяли методом иммуноферментного анализа, используя наборы стандартов: «Testosterone ELISA EIA-1559» и «Estradiol ELISA EIA-2693» («DRG Instruments GmbH», Германия). Идентификация МЭЖК выполнена в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа «Кристалл 5000» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия, Йошкар-Ола) с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором и калибровочной смеси эфиров жирных кислот «Supelco 37 component FAME mix». Содержание пестицидов — методом газовой хроматографии с помощью газового хроматографа «Кристалл 5000» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия, Йошкар-Ола) с детектором электронного захвата, стандартных образцов 6 конгенов ПХБ фирмы «Supelco» и хлорированных пестицидов ХОП-5, включающих ДДТ и его метаболиты. Анализ макроэлементов проводили методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии с помощью сканирующего электронного микроскопа «SU3500» («Hitachi», Япония) и методом масс-спектрометрии с применением масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой «Plasma Quant MS Elite» («Analytik Jena», Германия), многоэлементного стандарта «IV-ICPMS-71A» («Inorganic Ventures», США) и стандартного материала «ERM®-CE278k» (ткани мидии *M. edulis*). Выделение и очистку БАВ липидной природы из гонад и ПП мидии *Mytilus galloprovincialis* из Чёрного моря осуществляли классическими методами: экстракцией, осаждением и отгонкой растворителей.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Концентрации тестостерона, эстрадиола, жирных кислот, макро- и микроэлементов в гонадах, половых продуктах и личинках мидий зависят от их пола, стадии репродуктивного цикла и цветовых морф.

2. Тестостерон, эстрадиол, жирные кислоты, макро- и микроэлементы экскретируются во время нереста в водную среду вместе с половыми продуктами.
3. Концентрация хлорорганических соединений в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах мидий зависит от половой принадлежности и стадии репродуктивного цикла. Полихлорбифенилы влияют на состав жирных кислот личинок.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечена большим объёмом фактического материала (более 1000 проб), многократностью повторения измерений и применением статистического анализа экспериментальных данных. Все полученные результаты и выводы подкреплены данными, приведенными в рисунках и таблицах.

**Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием, выполненным в соответствии с поставленными целью и задачами. Автором проведен сбор и обработка материала, статистический анализ полученных результатов. Диссертант принимал непосредственное участие в постановке экспериментов, проведении биохимических анализов, обсуждении результатов и написании текстов совместных статей. Диссертационная работа написана лично соискателем.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на семинарах отдела и доложены на отечественных и международных конференциях: международная научная конференция «Актуальные проблемы аквакультуры в современный период» (Ростов-на-Дону, 2015); XVIII международная научная конференция «Биологическое разнообразие Кавказа и Юга России» (Грозный, 2016); VII международная научно-практическая конференция «Проблемы и перспективы современной науки» (Москва, 2016).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, перечня сокращений и условных обозначений, а также списка литературы, включающего 258 источника, в т. ч. 189 — иностранные работы. Общий объем рукописи — 188 страниц. Работа включает 20 таблиц и иллюстрирована 18 рисунками.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 13 — в специализированных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, в т. ч. 9 статей и 4 патента; 4 — в сборниках материалов международных конференций. 7 статей входят в базы WoS и Scopus. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит в выборе и разработке методов исследования, получении экспериментальных данных, обсуждении и написании текста статей и тезисов. Права соавторов публикаций не нарушены.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность д. б. н. В. И. Рябушко и к. х. н. М. В. Нехорошеву за помощь в разработке методологии исследований, участие в написании совместных работ, а также за общее руководство и консультативную помощь при подготовке диссертации. Особую благодарность выражаю к. х. н. С. В. Капанову и к. б. н. Л. В. Малаховой за проделанную методическую работу, помощь в статистической обработке данных и участие в написании совместных работ.

## ГЛАВА 1 СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ И ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

**Тестостерон и эстрадиол.** Изучению стероидных гормонов у беспозвоночных предшествовало несколько важных открытий. В одном из таких открытий стероиды позвоночных обнаружили в тканях моллюсков [130]. Предполагали, что стероиды имели эндогенное происхождение и использовались в качестве гормонов так же, как у позвоночных животных. Во втором открытии ученым удалось идентифицировать в мягких тканях улиток, обитающих в устьях рек, противоположные соединения трибутилолова (ТВТ), вызывающие рост полового органа самцов [166, 167, 183, 198]. Еще одно открытие 80-х годов XX века совершили при работах по очистке сточных вод в Великобритании, когда при биомониторинге удалось выделить большое количество эстрогенов, вызывающих выработку незрелой рыбой вителлогенина (белка — предшественника желтка) [209].

В последние годы взгляды о происхождении стероидов в моллюках претерпели значительные изменения. В органах моллюсков обнаружены отдельные стероидные гормоны и системы их метаболизма, но остается открытым вопрос: «Стероиды в теле моллюсков формируются эндогенно или извлекаются из окружающей среды?» Известно, что моллюски не содержат генов ключевых ферментов, которые необходимы для превращения холестерина в стероиды позвоночных, а также генов, отвечающих за функционирование классических ядерных стероидных рецепторов [225, 226, 227].

До сих пор не найдено неопровержимых доказательств существования у моллюсков эндокринной системы, напоминающую по своим функциям систему позвоночных [225, 226, 227]. Единственный путь поступления стероидов в организм беспозвоночных — из среды обитания вместе с пищей и водой [250, 222, 223, 224, 225, 226, 227]. Огромное количество работ посвящено распределению стероидов в корме моллюсков: фитопланктоне, зоопланктоне,

бактериях (кроме стероидов, которые обычно не синтезируются бактериями и наземными растениями) [225, 226, 227, 250].

Все больше исследований показывают, что половые стероиды широко представлены в моллюсках [145]. Обладая высокой физиологической активностью, гормоны регулируют широкий круг процессов в живом организме: отвечают за нормальное развитие и функционирование половой системы (созревание гонад, необходимые структурные и биохимические изменения в репродуктивных органах), регулируют обменные процессы и т. д.

Эндокринная система мидии *M. galloprovincialis* изучена в меньшей степени по сравнению с другими группами моллюсков. До сих пор не определено содержание стероидных гормонов в сперме мидий, являющейся ценным источником физиологически активных веществ. Тестостерон обнаружен в гонадах мидий, но его количество не изучено в зависимости от стадии репродуктивного цикла и в половых продуктах [119].

Гормон тестостерон является стимулятором роста животных, в т. ч. гидробионтов [34], отвечая за созревание гонад, структурные и биохимические изменения в репродуктивных органах, а также за половое поведение [58, 69].

Эстрадиол регулирует размножение и формирование половой системы преимущественно у самок. Более 78% эстрадиола в тканях мидии *M. galloprovincialis* находится в виде эфира жирных кислот [143, 147]. Эстрадиол много раз обнаруживали среди продуктов метаболизма холестерина в опытах с ракообразными, иглокожими, моллюсками и асцидиями [34]. Однако ни разу не удалось наблюдать его биосинтез, т. е. C19 – C18-трансформацию в моллюсках. У позвоночных животных эстрадиол образуется из тестостерона, что в 1939 году предположили Натансон и Туан, а позже подтвердил Баггетт [136].

Тестостерон и эстрадиол, выделяемые вместе с половыми продуктами, активно участвуют в жизнедеятельности как самих мидий, определяя их пол [101], так и других беспозвоночных, а также являются потенциальными стимуляторами полового поведения животных [58, 69].

Действие половых стероидов, прежде всего, направлено на размножение вида и призвано обеспечить наличие сильных особей. Все стероидные гормоны схожи по свойствам: их молекулы липофильны, поэтому стероиды не являются структурными компонентами клеток; они не используются как источник энергии; способны специфически взаимодействовать с клетками, имеющими рецепторы для данного гормона; обладают высокой биологической активностью, эффективно воздействуя на клетки в очень низких концентрациях. Клетки-мишени взаимодействуют с гормонами посредством белков-рецепторов, расположенных внутри различных органелл клеток. Белок-рецептор состоит как минимум из двух доменов, которые выполняют функции узнавания гормона, преобразования и передачу полученного сигнала в клетки. Процесс связывания рецептора с сигнальной молекулой можно описать моделью фермент-субстратного комплекса. Проблема современной науки состоит в том, что большинство рецепторов не изучено, так как их выделение и очистка очень сложны, но известно, что гормоны взаимодействуют со своими рецепторами физико-химическим путем. Между молекулой гормона и рецептором формируются электростатические и гидрофобные взаимодействия [5].

Различие уровней стероидных гормонов между тканями самцов и самок мидий и зависимость содержания стероидных гормонов от сезона уже доказаны [146]. Эти факты показывают физиологическую роль половых стероидов у беспозвоночных.

Присутствие тестостерона и  $17\beta$ -эстрадиола в моллюсках часто связывают с их участием в размножении. Существует мнение, что наиболее вероятный источник тестостерона, например, у мидии *Mytilus* spp. — из воды. Доказано, что мидии экспоненциально быстро снижали воздействие радиоактивного изотопа тестостерона ( $[^3H]$ -тестостерона) в закрытом контейнере, наполненном водой. Это исследование подтвердило, что мидии легко усваивают тестостерон из воды, а затем этерифицируют его вместе с метаболитами тестостерона. После извлечения органическими растворителями из тканей мидий липидной фракции (с последующим щелочным гидролизом), результаты высокоэффективной

жидкостной и тонкослойной хроматографии показали, что эта фракция преимущественно состояла не только из «свободного» тестостерона (менее 10%), а также из 5 $\alpha$ -дигидротестостерона (приблизительно 50%), 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -андростан-3-она (приблизительно 35%) и неопознанного метаболита (менее 10%). Мидии с трудом перерабатывали сложные эфиры тестостерона, так как не наблюдали значительного снижения общей радиоактивности или каких-либо изменений в профиле метаболитов даже через 10 дней эксперимента [222, 223, 224].

Так как в эндокринной системе моллюсков выявлены структурно-функциональные элементы, присущие эндокринной системе позвоночных [34], то можно утверждать о сходстве основных интегративных механизмов у всех многоклеточных животных. У беспозвоночных и позвоночных выделены два основных типа тканей. Первый тип тканей представлен нейросекреторной системой, продуцирующей нейросекреторные гормоны, являющиеся по химической природе белками, а другой — специализированными эпителиальными железами, например, гонадами, продуцирующими стероидные гормоны. Можно встретить ряд аргументов в пользу биосинтеза стероидов у беспозвоночных: изменение концентраций стероидов в зависимости от стадии репродуктивного цикла, жизненного цикла и т. д. [21]; описание наличия и функциональной значимости гормональных рецепторов у моллюсков и существенные отличия количественного содержания стероидов в органах, несущих разную функциональную нагрузку [22, 23]. Тем не менее, результаты исследований, проводимых в лабораторных условиях, вызывают сомнения в однозначности полученных данных. Моллюски не могут быть выращены из яйцеклеток в полностью «стерильных» условиях, так как их пища, вода и воздух не могут быть полностью лишены каких-либо следов стероидов позвоночных. Примечательно, что у моллюсков, находящихся в лабораторных условиях, где отсутствуют всякого рода загрязнения, тестостерон и эстрадиол так же, как у людей, постоянно выводится через поверхность тела [225, 226, 227]. Наличие в моллюсках стероидов, выделяемых позвоночными, не может рассматриваться как

доказательство эндогенного биосинтеза или эндокринной роли стероидов [138, 225, 226, 227]. До сих пор не найдено неопровержимых доказательств существования у моллюсков эндокринной системы, напоминающую по своим функциям систему позвоночных [34, 119, 138]. Стероидные гормоны в организме беспозвоночных не способны распадаться, т.к. не обнаружены ферментные системы, обеспечивающие их распад. В основном происходит модификация белковых радикалов, вводятся дополнительные гидроксильные группы, гормоны становятся гидрофильными. Образуются молекулы, представляющие собой структуры стерана (у стерана кетогруппа находится в семнадцатом положении) [147].

Большинство существующих исследований половых стероидов позвоночных, обнаруженных к настоящему времени у моллюсков, сводятся к трем гипотезам: стероиды позвоночных обнаружены у моллюсков из-за ограничений аналитических процедур; сами моллюски биосинтезируют стероиды; моллюски накапливают стероиды из окружающей среды [225, 226, 227]. Мидии постоянно подвергаются воздействию экзогенных стероидов в течение всего их жизненного цикла, поэтому сложно определить происхождение стероидов в их тканях. Моллюски, как известно, богаты ферментами, которые могут гидролизовать стероидные конъюгаты, поэтому мидии способны поглощать стероидные конъюгаты из окружающей среды и превращать их в «свободные» стероиды. Все это может быть объяснением появления стероидных гормонов у беспозвоночных [77].

У моллюсков уже найдены существенные отличия количественного содержания стероидов в органах, несущих разную функциональную нагрузку [34, 96, 119, 138]. В гонадах двустворчатых моллюсков показано присутствие половых стероидных гормонов, установлена зависимость их количественного содержания от стадии жизненного цикла, выдвинуты предположения о физиологической значимости этих соединений [7, 8]. Анализ тестостерона и эстрадиола в тканях мидии *M. edulis* показал максимальный уровень свободных стероидов в гонадах, по сравнению с периферическими тканями. Этот факт может объяснить роль

гонад в экскреции стероидов. В результате исследований гемолимфы мидии *M. galloprovincialis* [181, 182] показано, что уровни 17- $\beta$ -эстрадиола у самцов напрямую связаны со стадией репродуктивного цикла мидий. 17- $\beta$ -эстрадиол усиливал высвобождение сперматозоидов и нерест. Поэтому этот гормон можно рассматривать не только как индикатор стадий репродуктивного цикла мидий, но и как половой индикатор. Уменьшение концентрации 17- $\beta$ -эстрадиола во время гаметогенеза указывает на наличие специфических изменений во время репродуктивного цикла мидий. Уровни 17- $\beta$ -эстрадиола у самок имеют самые высокие значения в конце репродуктивного цикла. Подобные различия могут быть связаны со специфическими потребностями самок и самцов мидий во время гаметогенеза, а также с различиями в составе жирных кислот в гонадах, сперматозоидах и яйцеклетках [155].

Существует много фактов поглощения моллюсками стероидов позвоночных из окружающей среды, а также хранения некоторых из них путем конъюгации с жирными кислотами в течение нескольких недель и даже месяцев [225, 226, 227]. В свободном состоянии тестостерон и эстрадиол не подвергаются гидролизу, т. к. не являются производными жирных кислот. Поэтому очень важно сохранение баланса между свободными и связанными с ЖК формами стероидов. В свободном состоянии избыток стероидных гормонов губителен для живых организмов [146].

Для моллюсков этерификация тестостерона с жирными кислотами — это механизм, который позволяет поддерживать гормональный уровень [116]. Уровни этерифицированных стероидов во всех типах тканей моллюсков примерно 1,6–9,6 нг·г<sup>-1</sup> сырого веса, хотя доля этерифицированных стероидов от общего уровня стероидов выше в периферических тканях и составляет от 93% до 98%, чем в гонадах — от 53% до 73% [165]. У улиток количество сложных эфиров тестостерона и жирных кислот увеличивалось прямо пропорционально уровню общего тестостерона [127, 128].

Таким образом, работы современных авторов показывают, что у моллюсков и у других беспозвоночных отсутствуют собственные стероиды [145, 240].

Эндогенное происхождение стероидных гормонов позвоночных в организме беспозвоночных невозможно доказать только методом измерения концентрации стероидов. Существует ряд причин, которые могут вносить значительную неопределенность в результат измерений:

а) усвояемость стероидов, т. е. различие в доступности стероидов, поступающих с водой или пищей, и разница в физиологическом состоянии животных (например, при скудной кормовой базе снижается скорость фильтрации);

б) причины, потенциально влияющие на баланс между свободными и этерифицированными стероидами, т. е. разные скорости образования стероидных эфиров, разные скорости гидролиза стероидных эфиров, возраст животных (пожилой организм накапливает больше этерифицированных стероидов, чем молодой);

в) причины, влияющие на метаболизм свободных стероидов (разница в активности ферментов);

г) способность животных сохранять свободные стероиды, обусловленная содержанием воды, белков (белки способны замедлить скорость выведения или этерификации свободных стероидов), липидов (теоретически все стероиды растворимым в жирах);

д) методические ошибки эффективности выделения стероидов, «ложные срабатывания» при иммуноферментном анализе [225, 226, 227], а также ошибки в расчетах [118].

У беспозвоночных обнаружены ферменты, аналогичные ароматазе позвоночных [126, 133]. Тем не менее, эти ферменты отличались с ароматазой по структуре, что ставит под сомнение аналогичное действие ферментов позвоночных и беспозвоночных животных [225, 226, 227]. Поэтому, исходя из представленных концепций, нельзя с уверенностью заявлять, что любая функция, регулируемая гормонами в организме позвоночных, сходным образом регулируется и у беспозвоночных.

Механизм воздействия половых гормонов на жировой обмен пока не выяснен, но уже известно, что действие половых гормонов однонаправленное: стимуляция распада жира. Мидии могут аккумулировать  $17\beta$ -эстрадиол и тестостерон из воды, метаболизировать стероиды и этерифицировать с жирными кислотами, что приводит к накоплению гормонов в тканях.

Доказано, что в организме моллюсков, как у всех уже исследованных видов беспозвоночных, стероидные гормоны преимущественно этерифицированы жирными кислотами [146]. В процессе этерификации стероид должен иметь реакционноспособную гидроксильную группу для конъюгации с жирной кислотой, которая в тестостероне и, вероятно, в эстрадиоле, является  $\beta$ -гидроксильной группой на семнадцатом углеродном атоме. Хотя «свободный» тестостерон не может быть непосредственно этерифицирован, тем не менее, он может превращаться в метаболиты [222, 223, 224].

Мидия *M. galloprovincialis* может синтезировать длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты, выступающие в роли ингибиторов процессов перекисного окисления липидов [207]. Также установлено, что содержание арахидоновой ( $C_{20:4\omega 6}$ ), эйкозапентаеновой ( $C_{20:5\omega 3}$ ) и докозагексаеновой ( $C_{22:6\omega 3}$ ) кислот значительно увеличивалось после тестостеронового воздействия на мидии [116]. С уверенностью можно лишь сказать, что действие половых гормонов однонаправленное: стимуляция распада жира.

Еще одним ярким примером действия тестостерона является изучение его влияния на нейросекрецию и гаметогенез мидии *M. galloprovincialis*. При введении в тела инактивированных мидий тестостерона через 38 суток после инъекции в опытной группе было на 25% больше готовых к нересту животных. Тестостерон способствует ускоренному росту и созреванию гамет, переводя тем самым гонаду к более ранней стадии развития. Поскольку процесс созревания ооцитов мидий обеспечивается путем абсорбции жиров и углеводов из гемолимфы, снижение уровня тестостерона приводит к увеличению запасов жира. Это вполне согласуется с известным мощным анаболическим действием

тестостерона. Проведенный анализ позволяет заключить, что у мидии *M. galloprovincialis* существует тесная взаимосвязь эндокринной и нейроэндокринной систем, при регулирующем влиянии последней [34].

У моллюсков отсутствует жировая ткань — гормонально активный «орган», являющийся «депо» активной продукции и метаболизма стероидов, что обеспечивается активностью ароматаз, позволяющих конвертировать фракции циркулирующих андрогенов (андростендион и тестостерон) в эстрогены (эстрон и эстрадиол, соответственно). Общая связь между количеством жировой ткани и содержанием эстрогенов была выявлена в ходе исследований, проводимых Ю. В. Ковалевой [18].

Подводя итог вышесказанному, можно выделить несколько основных проблем, связанных с исследованиями тестостерона и эстрадиола в мидиях. Подобные исследования дорогостоящие, продолжительны по времени и не дают однозначного ответа на вопрос происхождения тестостерона или эстрадиола в организм мидий. До сих пор не проводили измерение концентрации стероидов в сперме моллюсков и в гонадах по стадиям репродуктивного цикла. В дальнейшем представляется интересным исследовать влияние различных факторов, например, органических загрязнителей, освещенности или ионизирующей радиации на способность гонад и половых продуктов мидий накапливать и экскретировать половые гормоны.

**Жирные кислоты.** В организме моллюсков, как у всех уже исследованных видов беспозвоночных, кроме других функций, ЖК играют важнейшую роль — конъюгируют стероидные гормоны [146]. Конъюгация с жирными кислотами может выступать в качестве механизма для поддержания эндогенного уровня свободных и связанных форм половых гормонов, так как единственный путь поступления стероидов в организм — вместе с пищей и водой [222, 223, 224]. Информации о физиологической функции сложных эфиров стероидов в моллюсках нет. Известно, что конъюгация с ЖК (или этерификация) переводит стероиды в аполярные формы, которые сохраняются в организме. При этом

биологическая активность, биодоступность и подверженность элиминации этих форм снижается [90, 143, 147].

ЖК у морских двустворчатых моллюсков встречаются преимущественно в связанном (этерифицированном) виде в составе эфиров холестерина, ацилглицеридов и фосфолипидов [173]. В современной литературе немало работ, посвященных ЖК-составу у моллюсков [84, 85, 100, 105, 155]. Показано, что содержание жирных кислот в мидии *M. galloprovincialis* связано с содержанием тестостерона [116]. Так, при последовательном увеличении концентрации тестостерона в воде (от 20 до 200 нг·л<sup>-1</sup> и далее до 2000 нг·л<sup>-1</sup>) уровни общего («свободного» и этерифицированного) тестостерона в тканях мидий резко увеличивались. Уровни «свободного» эндогенного тестостерона значительно возрастали при воздействии высокой концентрации экзогенного тестостерона. При воздействии низких и средних концентраций экзогенного тестостерона содержание пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) жирных кислот снижалось до 32% по сравнению с контролем. Отмечен рост эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3), докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) и арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) ПНЖК (до 46% суммарного содержания жирных кислот). Уровень МНЖК не изменялся. Полученные результаты свидетельствовали о том, что этерификация избытка тестостерона жирными кислотами может действовать как гомеостатический механизм для поддержания стабильного уровня эндогенного «свободного» тестостерона. При этом уровень «свободного» тестостерона остается на физиологически приемлемом уровне.

Этерификация тестостерона и эстрадиола жирными кислотами хорошо описана для брюхоногих моллюсков *Ilyanassa obsoleta* и двустворчатых моллюсков *Crassostrea virginica* и *M. galloprovincialis*. Конъюгаты жирных кислот регулируют физиологические уровни свободных стероидов в тканях моллюсков [127, 128; 143, 144; 145, 147]. Моллюски поглощают стероиды, выделяемые позвоночными из окружающей среды, конъюгируя их с C16 и C18 жирными кислотами [225, 226, 227]. Этерификация тестостерона с жирными кислотами служит для инактивации и хранения избыточного тестостерона.

В некоторых исследованиях, изучающих влияние факторов окружающей среды на сезонные колебания концентраций жирных кислот в двустворчатых моллюсках, доказано, что без учета эндогенных факторов статистические результаты не показывают никакой связи между изменением концентрации жирных кислот и температурой [220]. Но с учетом таких факторов, как обмен веществ, питание [108] или сезон [155], наблюдается прямая связь между содержанием жирных кислот в органах моллюсков и стадией репродуктивного цикла. Показано, что уровни «свободного» тестостерона в тканях улиток регулируются процессами этерификации/деэтерификации жирных кислот, и эта регулирующая функция способствует сезонным колебаниям уровня «свободного» тестостерона. Среди отобранных в полевых условиях улиток тестостерон существовал преимущественно в «свободной» форме в начале и в конце периода кладки яиц. В других случаях большую часть тестостерона удалось выделить в виде сложных эфиров жирных кислот [127, 128]. НЖК выполняют преимущественно защитную функцию, формируя оболочки клеточных мембран [62] и, вероятно, участвуют в этерификации стероидных гормонов, так как в этот процесс вовлечены преимущественно C16 и C18 НЖК [225, 226, 227]. Этерификация тестостерона с жирными кислотами может быть механизмом, регулирующим концентрацию «свободного» тестостерона, уровень которого может возрастать под действием различного рода загрязнителей [127, 128].

Например, мидии *M. edulis* способны поддерживать концентрацию свободных стероидов в гонадах без изменений через гомеостатические механизмы: конъюгирование с жирной кислотой (избыток тестостерона превращается в эфиры жирных кислот под действием фермента ацетил-КоА-тестостерон-ацетилтрансферазы и накапливается в организме) или образование сульфатных конъюгатов [165]. ЖК-профиль мидий, подвергшихся воздействию самой высокой концентрации экзогенного тестостерона, практически не изменялся [115, 116, 117]. Можно предположить, что при высокой концентрации тестостерон действует аналогично ксенобиотикам, которые поглощаются и накапливаются мидиями, подобно полихлорбифенилам (ПХБ).

Ранее исследованы классы липидов, ЖК и половых гормонов у культивируемой на юге Испании мидии *M. galloprovincialis* [181, 182]. Триглицериды и фосфолипиды были основными липидными компонентами в мантии и пищеварительной железе самок и самцов. Уровень общих липидов был выше у самок, чем у самцов. Триглицериды преобладали в тканях самок, а фосфолипиды — у самцов. Содержание липидов в мантии самок увеличивалось в процессе репродуктивного цикла. А в пищеварительной железе содержание липидов возрастало у самок и самцов в начале репродуктивного цикла, но снижалось в конце цикла. Эти результаты свидетельствовали о накоплении липидов в оплодотворенных яйцеклетках для дальнейшего развития личинок, а также в качестве источника энергии в ооцитах. В мантии и пищеварительной железе наблюдали повышение уровня омега-3 ПНЖК во время созревания гонад, главным образом, из-за докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) кислоты. Основными ЖК у самок и самцов мидий были: пальмитиновая (C16:0), эйкозапентаеновая (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновая (C22:6 $\omega$ 3) кислоты. У самок процент МНЖК в мантии и пищеварительной железе выше, чем у самцов, а уровень НЖК ниже, чем у самцов. У обоих полов были обнаружены изменения в прогестероне и 17- $\beta$  эстрадиоле во время развития гонад [181, 182].

Насыщенные и ненасыщенные ЖК поступают в организм мидий вместе с пищей и водой, а затем используются в процессах, поддерживающих их жизнедеятельность [44, 199]. Большая часть ЖК поступает в ткани мидий из микроводорослей и накапливается на протяжении жизненного цикла [62, 199].

У моллюсков ПНЖК, вероятно, являются предшественниками простагландинов [215]. Эйкозапентаеновая (C20:5 $\omega$ 3) и арахидоновая (C20:4 $\omega$ 6) жирные кислоты — субстраты в синтезе физиологически активных эйкозаноидов: простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов. Эйкозаноиды оказывают различное физиологическое действие, включая размножение: стимуляцию нереста и способность производить яйцеклетки [115, 116, 117, 237].

Суммарное содержание простагландинов в моллюсках невысокое [242], тем не менее, простагландины и родственные им эйкозаноиды, являясь

кислородсодержащими метаболитами ПНЖК С20, оказывают физиологическое воздействие на нерест у двустворчатых моллюсков [237].

У позвоночных ЖК семейства омега-6 и омега-3 выполняют важную физиологическую роль при биосинтезе простагландинов [25]. ПНЖК семейства омега-6 и омега-3 взаимозаменяемы благодаря альтернативному действию ферментов десатураз и элонгаз. Степень, с которой данный вид на определенной стадии репродуктивного цикла может преобразовать одни омега-3 или омега-6 в другие жирные кислоты, определяет степень важности жирной кислоты для этого вида на определенной жизненной стадии [25, 201]. Морские моллюски способны эндогенно удлинять и десатурировать ЖК-предшественники с образованием омега-3 жирных кислот под действием десатуразы и элонгазы [241]. Следует отметить, что существуют пути синтеза ПНЖК, которые не требуют десатурации НЖК. Поликетидсинтазные системы проводят те же реакции, но в сокращенной последовательности. Предполагают, что у морских рыб большая часть ПНЖК первоначально синтезируется именно по поликетидсинтазному пути [188].

В гонадах мидии *M. galloprovincialis*, обитающей в прибрежной акватории Южной Африки, уже обнаружено высокое содержание ПНЖК: арахидоновой (С20:4 $\omega$ 6), эйкозапентаеновой (С20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновой (С22:6 $\omega$ 3) [208]. Эти кислоты, прежде всего, необходимы для поддержания структуры и функционирования клеточных мембран. В связи с этим отметим, что при исследовании ЖК фосфолипидов мышечной ткани мидии *M. edulis* из Белого моря установлено, что в разных условиях обитания изменение индекса ненасыщенности (ИН) не превышал диапазона от 15% до 20% [66]. Такое ограничение позволяет поддерживать жидкостность мембран на уровне, необходимом для нормальной жизнедеятельности клетки [117].

Результаты, полученные при исследовании у берегов Испании устрицы *Ostrea edulis*, показали сезонную вариабельность ЖК-состава в её органах [70]. Различия в ЖК-составе у разных видов двустворчатых моллюсков объясняются выбором пищевых ресурсов, так как большая часть ЖК поступает в ткани мидий из микроводорослей [44, 112, 159, 181, 182]. Поскольку у двустворчатых

моллюсков ограничен или вообще отсутствует синтез C20 – C22 ПНЖК с более чем тремя двойными связями, они приобретают большинство ПНЖК, например, эйкозапентаеновую (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновую (C22:6 $\omega$ 3), из пищи, обогащенной этими кислотами [249].

Наличие докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) кислоты у мидии отражает способность к адаптациям с характерными структурными и функциональными механизмами «перестройки», протекающими в биологических мембранах в ответ на изменение условий окружающей среды (температура, соленость и другие факторы) [104, 192, 199]. Присутствие эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3) кислоты в высоких концентрациях является показателем потребления моллюсками диатомовых микроводорослей. Наличие ЖК с нечетным числом атомов в цепи (пентадециловой (пентадекановой) (C15:0) и маргариновой (C17:0)) и с разветвленной цепью (4,8,12-триметилтридекановой) является биомаркером потребления мидиями бактерий [129].

В результате тщательного изучения ЖК-состава мидий, показано, что оценка ЖК-состава и роль ЖК в жизненном цикле мидий должна основываться на эколого-физиологических закономерностях потребления и трансформации веществ в конкретных условиях существования. Поскольку преимущественно насыщенные C16 – C18 жирные кислоты этерифицируют стероиды, то любые изменения в соотношении насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в тканях являются результатом биохимических перестроек в организме мидий, вызванных характером приспособления к условиям окружающей среды (температура, соленость, действие поллютантов и т. д.). Очевидно, это явление влияет на уровень стероидных гормонов в тканях и половых продуктах мидий.

**Хлорорганические соединения в гонадах и половых продуктах мидий.** В связи со способностью мидий к биоаккумуляции, при изучении уровней стероидных гормонов и жирных кислот следует учитывать загрязненность морской среды органическими поллютантами. Установлено, что этерификация тестостерона с ЖК может быть механизмом, который регулирует концентрацию «свободного» тестостерона, уровень которого может возрастать под действием

различного рода загрязнителей [127, 128]. Некоторые защитные реакции мидий, вызванные воздействием сырой нефти или смеси сырой нефти с алкилфенолами, были аналогичны тем, которые наблюдали у моллюсков при воздействии самых высоких концентраций эстрадиола [146].

Синтетические хлорорганические соединения, к которым относятся хлорированные ХОП (ДДТ и ПХБ), являются одними из наиболее опасных веществ, загрязняющих окружающую среду и живые организмы [131, 134, 254]. В морскую среду ХОС попадают вместе со стоками, а также с атмосферными осадками. Установлено [32], что приток ДДТ в Мировой океан осуществляется из атмосферы и с материковым стоком, тогда как единственным значительным процессом, удаляющим ДДТ из океана, является его разложение, способное длиться десятилетиями [194].

Многочисленные исследования показали, что в различных районах Мирового океана вместе с липидами в мидиях накапливаются липофильные ХОС [97, 185, 246]. ПХБ и ДДТ в настоящее время обнаруживают во всех компонентах экосистемы прибрежных районов Крыма: в воде, донных отложениях и гидробионтах [41, 28, 29, 179].

Хлорорганические поллютанты вызывают метаболические и гормональные расстройства в моллюсках [216]. Известно, что в мидиях ХОС концентрируются в количествах, значительно превышающих содержание поллютантов в среде обитания [106].

Мидия *M. galloprovincialis* из Чёрного моря способна накапливать в липидах стойкие органические загрязнители: полихлорированные бифенилы и хлорорганические пестициды, характеризующиеся высокой устойчивостью, токсичностью и способностью к биоаккумуляции [95, 97, 195, 246]. ХОС обладают высокой растворимостью в липидах, поэтому они аккумулируются в обогащенных липидами тканях мидий с увеличением концентрации в каждом следующем звене пищевой цепи [184, 239].

Загрязнители имеют тенденцию к биоаккумуляции в тканях, богатых липидами [131, 196], так как характеризуются устойчивостью к разрушению,

низкой растворимостью в воде и высокой растворимостью в липидах, которая увеличивается с увеличением количества атомов хлора [106, 203, 236]. Прямой связи между стадией репродуктивного цикла, содержанием липидов и накоплением ПХБ, ДДЦ и ГХЦГ в мидиях не наблюдали, однако отмечали высокую корреляцию, полученную между общим содержанием липидов и хлорорганическими загрязнителями [239]. Накопление ПХБ и ДДТ в тканях моллюсков не показало корреляции с температурой и количеством осадков, но было обратно пропорционально солености [206].

Результаты недавних исследований указывают на то, что в тканях пресноводных моллюсков органические загрязнители способны замещать собой стероидные гормоны, которые, как известно, у большинства беспозвоночных имеют экзогенное происхождение [77, 225, 226, 227]. Такие органические загрязнители, как природные и синтетические гормоны, а также фармацевтические препараты и средства личной гигиены, в городских сточных водах способны разрушать эндокринную систему моллюсков, что может превратиться в серьезную проблему для морской экосистемы. Так, если концентрация тестостерона в тканях мидий составляла от 6,3 до 20 нг·г<sup>-1</sup> сухого веса, а концентрация синтетических химических веществ, например, бисфенола А, триклозана и салициловой кислоты — от 24 до 47 нг·г<sup>-1</sup> сухого веса, то после воздействия органических загрязнителей в течение 7, 21 и 42 дней в лабораторных условиях тестостерон больше не обнаруживали в тканях мидий, но были обнаружены относительно высокие уровни этих токсикантов. Отсутствие тестостерона в мидиях после того, как они подвергались воздействию органическими загрязнителями в лабораторных условиях в течение нескольких недель, вероятно, связано с тем, что мидии могут высвобождать тестостерон обратно в воду или конъюгировать его с жирными кислотами для стабилизации экзогенного «свободного» тестостерона [115, 116, 117, 225, 226, 227]. Этерификация жирных кислот является ключевым механизмом, который позволяет мидиям поддерживать нормальный уровень стероидов после воздействия окружающей среды.

Поскольку измерение концентраций этерифицированных стероидов в тканях мидий вызывает ряд трудностей, сложно объяснить механизмы увеличения концентраций тестостерона и 17 $\beta$ -эстрадиола у моллюсков под действием органических загрязнителей. Но вполне возможно, что такие органические загрязнители, как бисфенол А, салициловая кислота и триклозан, могут действовать как ксеноэстрогены, поскольку они имеют химическую структуру, сходную с эстрогенами, и могут влиять на эндокринные системы водных организмов. Так, триклозан у самцов карпа *Cyprinus carpio* из залива Лас-Вегас уменьшает количество сперматозоидов и индуцирует вителлогенин [148, 170], что, несомненно, отражается на профиле состава жирных кислот, а именно, уменьшению концентрации полиненасыщенных жирных кислот. Таким же эффектом в организме моллюсков обладают и ПХБ [148]. Поэтому неблагоприятные воздействия ксеноэстрогенов на водные беспозвоночные требуют дальнейших исследований.

**Влияние полихлорбифенилов на состав жирных кислот мидий.** Для детальной оценки степени влияния поллютантов необходимо изучать развитие мидий на всех её стадиях, в том числе эмбриональных и личиночных. В условиях загрязненности среды обитания наблюдали торможение и остановку роста личинок моллюсков [38].

Хлорорганические поллютанты вызывают метаболические и гормональные расстройства в моллюсках [216]. Уровень биоаккумуляции ХОС в гонадах мидий зависит как от их концентрации в воде, так и от физиологического состояния мидий, в частности, от липидного профиля. ЖК редко встречаются в природе в виде свободных молекул, обычно они выступают в качестве компонентов многих сложных липидных молекул. Липиды аккумулируют в себе химическую энергию восстановленных форм углерода в морских экосистемах. Жиры также являются растворителями и абсорбционными носителями для органических загрязнителей и могут выступать в качестве движущих сил биоаккумуляции загрязнителей. Именно ЖК среди всех липидов считаются важными детерминантами здоровья и стабильности экосистемы.

Изучению влияния загрязнителей на культивируемую мидию *M. galloprovincialis*, обитающей в природных условиях морской акватории г. Севастополя, посвящен ряд работ, в которых рассматривали взрослых особей [44, 47, 48, 107, 254].

Известно, что мидии устойчивы к различным видам загрязнения. Являясь фильтраторами, мидии активно накапливают загрязнения в организме, т. к. синтетические поллютанты не способны усваиваться в организме моллюсков.

Одними из наиболее токсичных загрязнителей окружающей среды являются ХОС. Широкая распространенность ХОС в воде Чёрного моря определяет загрязнение естественных популяций моллюсков во многих морских акваториях, поскольку мидии аккумулируют гидрофобные ХОС даже при относительно низкой их концентрации в морской воде. Организм мидий воспринимает крупные молекулы ХОС, как, например, жирные кислоты с разветвленной структурой. В мидиях из бухт г. Севастополя содержание суммарных полихлорбифенилов ( $\Sigma$ ПХБ<sub>6</sub>) в пересчете на сырую массу моллюсков изменялось в диапазоне от 3,8 нг·г<sup>-1</sup> (в жабрах) до 459,0 нг·г<sup>-1</sup> (в гепатопанкреасе) [29]. В бухте Ласпи, где антропогенное влияние не так сильно выражено, концентрация ХОС ниже и составляла в жабрах от 0,21 нг·г<sup>-1</sup> до 10,3 нг·г<sup>-1</sup> — в гонадах. Накопление ХОС в органах мидий положительно коррелировало с содержанием в них общих липидов.

В экспериментальных условиях установлены хромосомные aberrации в оплодотворенных яйцеклетках мидий при воздействии растворов поверхностно-активных веществ [38]. Изучено эмбриональное развитие двустворчатых моллюсков в норме и при воздействии тяжелых металлов [27]. Показана положительная корреляционная связь между содержанием хлорорганических соединений в воде и смертностью пелагической икры и отрицательная — с численностью личинок рыб на ранних этапах постэмбрионального развития [156].

При изучении спермы карпа *C. carpio* установлено [148], что между конгенерами полибромдифениловых эфиров и фрагментацией ДНК сперматозоидов отмечена положительная корреляция, что свидетельствуют о

генотоксическом действии органических поллютантов. Органические загрязнители играют весьма заметную роль в репродуктивной физиологии моллюсков. Под действием органических поллютантов снижается митохондриальная функция и подвижность сперматозоидов. Подвижность сперматозоидов напрямую зависит от содержания в них ПНЖК [155].

Исходя из всего вышеперечисленного, можно сделать вывод, что у мидий исследование ЖК-состава, а также содержание стероидных гормонов, необходимо проводить не только у взрослых особей на всех стадиях репродуктивного цикла и в половых продуктах, но и на стадиях эмбрионального развития. Так как гормоны являются жирорастворимыми соединениями, то и соотношение «связанных» и «свободных» форм стероидов в личинках может изменяться вместе с ЖК-составом. В дальнейших исследованиях было бы интересным проследить подобную взаимосвязь, так как первые трое суток трохофоры находятся исключительно на пассивном питании, а значит биохимические перестройки, происходящие в личинках, не зависят от источников пищи.

**Элементный состав мидий.** Мидия *M. galloprovincialis* является массовым видом для шельфа черноморского региона, ее поселения отмечены на иловых и скальных субстратах, значительно отличающихся по условиям обитания. Для иловых поселений характерны моллюски со светло-коричневой окраской раковин, для скальных — черно-фиолетового цвета. В литературе распространено понятие «цветовая морфа», основанное на окраске раковин мидии. У мидий выделяют две основные цветовые морфы: черную и коричневую. Считается, что окраска раковины является маркером комплекса генов, детерминирующих ряд физиологически значимых признаков. Так, для разноокрашенных мидий обнаружена разница в прочности и скорости образования биссусных нитей, темпах соматического роста тканей, плодовитости, выживаемости, резистентности к паразитам. Между морфами существенно отличается состав изоферментных спектров 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и неспецифических эстераз, разнятся активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, состав каротиноидов [161, 162].

Несмотря на то, что признак окраски створок широко применяют при исследовании данного моллюска, выделение цветовых морф в большинстве случаев осуществляется визуально, количество выделяемых фенотипов у разных авторов варьирует [161, 162]. Сведения об элементном составе мидий, относящихся к разным цветовым морфам, с последующим определением функциональных различий между ними, в литературе отсутствуют.

Как и многие морские организмы, мидии обладают потенциалом поглощения как эссенциальных, так и неэссенциальных элементов из окружающей среды [122; 210, 211, 251, 252], что связано со схожим электронным строением атомов поглощаемых элементов. Металлы, полученные из пищи, связаны с мягкими тканями; металлы из воды — с раковинами мидий [120]. Даже эссенциальные элементы, например, Se, накапливаясь в количествах, превосходящих метаболические требования мидий, могут становиться вредными для организма [98, 210, 211], а некоторые неэссенциальные металлы, в частности, Hg, Cd и Pb, проявляют высокую токсичность даже при сравнительно малых концентрациях [79, 99]. Тем не менее, морские организмы способны детоксифицировать накопленные элементы путем их секвенирования на участках, связывающих металлы [180, 212, 213], во взвешенной фракции клеток (гранулы и лизосомы) [75] и в цитозоли (металлотioneин и подобные ему белки) [75, 124, 229]. Это, по-видимому, обусловлено генетически. Избыточные количества микроэлементов могут в конечном итоге выводиться с фекалиями, мочой [248] и, возможно, другим путем. Таким образом, мидии играют важную роль в круговороте микроэлементов, концентрируя их из взвешенных частиц фекального материала или половых продуктов [120].

Макро- и микроэлементы входят в состав БАВ: ферментов, витаминов, гормонов, пигментов. Установлено, что скорость роста мидий, а также характер связанных с ней метаболических процессов, отличаются у разных фенотипов этих моллюсков [80]. Биологические факторы, влияющие на накопление макроэлементов, включают в себя возраст, размер, пол, генотип, фенотип,

активность питания и степень репродуктивного цикла [88, 190, 212, 213, 216]. Основные микроэлементы, участвующие в размножении — Se и Zn.

Se — эссенциальный элемент для мидий. Приоритетным путем его поступления в организм является алиментарный с кормом — 90% и с водой — 10% [72]. Весь этот Se находится в двухвалентной органической форме, причем в животных продуктах преобладает селеноцистеин (Se-Cys), а в растительных — селенометионин (Se-Met). Se поступает в организм животных в основном в виде селенометионина. Транспорт и депонирование Se осуществляется селенпротеинами (селеноцистеином). Se является составной частью селенопротеинов, которые защищают сперматозоиды от окислительного повреждения в процессе их созревания. Селенопротеины также служат структурными компонентами зрелых сперматозоидов. Поэтому Se и селенопротеины обеспечивают жизнеспособность сперматозоидов, а также обеспечивают защиту от активных форм кислорода.

Исследования селенопротеинов на генном уровне показали, что их отсутствие во время сперматогенеза приводит к аномальному развитию сперматозоидов, что, в свою очередь, влияет на качество спермы, фертильность и либидо. Se — незаменимый фактор питания. В процессе обмена веществ возникают определенные взаимоотношения между Se, витамином E и серосодержащими аминокислотами как компонентами антиокислительной системы [2].

При исследовании селенопротеина жемчужной мидии *Cristaria plicata* удалось экспрессировать матричную рибонуклеиновую кислоту (МРНК) из тканей мантии, жабр, гемоцитов, мышц и гепатопанкреаса. Самая высокая экспрессия проходила из тканей гепатопанкреаса. Этот факт объясняется генетическим различием в генах, кодирующих селенопротеины, такие как селенопротеин P (основной внеклеточный источник Se) и семейство ферментов глутатионпероксидазы (катализируют восстановление гидроперекисей липидов в соответствующие спирты и восстановление пероксида водорода до воды) [140, 157].

Zn в допустимых концентрациях используется организмом животных для активации ферментов, синтеза ДНК и белков, а также для поддержки функций репродуктивной системы. В больших количествах Zn является поллютантом. Zn также действует как антиоксидант, подавляя способность свободных радикалов повреждать клеточную ткань и генетический материал. Наиболее вероятно, что экскреция Zn из мягких тканей мидий проходит через ооциты при нересте [177]. В мидии *M. galloprovincialis*, собранной в портах Западного Алжира, концентрация Zn изменялась в диапазоне от 87,1 до 731,5 мг·кг<sup>-1</sup><sub>сух.</sub> [135]. В сперматозоидах чёрноморских мидий содержание Zn составило  $30,4 \pm 6,4$  мкг·г<sup>-1</sup><sub>сух.</sub>, а в яйцеклетках —  $115,4 \pm 24,2$  мкг·г<sup>-1</sup><sub>сух.</sub> [17].

Изменения веса мидий связаны с различным количеством Zn в их мягких тканях. Масса раковин мидий, загрязненных Zn, значительно увеличилась после 51-дневного периода очищения [234]. Zn накапливался в мягких тканях пропорционально его концентрации в морской воде, в то время как концентрация в гемолимфе была выше, чем в окружающей среде [238]. Еще в работе И. Фредерика [123] проводили исследования некоторых беспозвоночных на предмет наличия в их тканях неорганических компонентов. Установлено, что концентрация неорганических ионов в мышцах и другие тканях значительно ниже, чем в гемолимфе, где концентрация неорганических веществ аналогична концентрации окружающей морской воде.

Поглощение Zn происходит через кишечник, мантию и жабры. Zn транспортируется из жабр и кишечника ( $t_{1/2} \approx 8$  дней) через гемолимфу в виде комплекса с высокой молекулярной массой или в виде гранулированных амебоцитов в почку. Большая часть Zn в организме присутствует в зернистых амебоцитах, которые находятся во всех тканях организма или в кишечнике и почках. Почка у мидии *M. edulis* образует основной орган хранения многих микроэлементов и содержит 30% Zn (около 1000 мкг·г<sup>-1</sup><sub>сух.</sub>). Zn локализуется в виде нерастворимых гранул в мембранно-элиминированных везикулах, занимающих около 20% объема клеток. Экскреция Zn происходит путем дефекации, экзоцитоза почечных гранул в мочу, диапедеза амебоцитов [238], а

также с половыми продуктами [16, 86]. В целом, большие количества многих элементов накапливают в гонадах самок мидий, что согласуется с измерениями в мягких тканях в преднерестовый период [9, 212, 213].

**Экскреция БАВ вместе с половыми продуктами.** Мидии играют важную роль в донных экосистемах, участвуя в процессе обмена вещества и энергии [60]. Увеличение количества морских ферм по выращиванию мидий приводит к возрастанию биомассы моллюсков в прибрежье, поэтому существует потребность в пересмотре и обновлении представлений о функционировании мидийных хозяйств. Так, уже исследован поток биологически активных веществ — каротиноидов в системе: «среда → мидия (*Mytilus galloprovincialis*) → биоотложения мидий» и получены предварительные балансовые данные о потоке каротиноидов из пищи мидии в биоотложения [43]. Установлена зависимость содержания Cd, Pb, Cu, Ni, Zn, Fe в мягких тканях и раковинах мидий от индивидуального возраста моллюсков [19, 17, 47, 48].

В системе «мидийная ферма → среда» важную роль играют биотические потоки веществ через гонады, половые продукты (сперма и яйцеклетки) и личинки. Поскольку гонады выполняют ключевую роль в размножении мидий, представляется интересным рассмотреть элементы «баланса» веществ, играющих непосредственное участие в этом процессе.

Тестостерон, эстрадиол, ЖК, а также Se и Zn, потребляемые моллюсками вместе с пищей и водой, необходимы моллюскам для осуществления нереста, а также для роста и развития [72, 177, 155, 195].

В литературе до настоящего времени отсутствовали сведения о количестве БАВ, выделяемых мидиями в акватории морской фермы вместе с половыми продуктами (спермой и яйцеклетками), хотя ранее было показано, что производные стероидов играют роль в гормональной регуляции метаболических процессов эукариот [250]. Имеются данные о содержании тестостерона и эстрадиола в гонадах типичного представителя инфауны двустворчатого моллюска *Sinonovacula constricta* [139]. Поскольку гормоны принимают непосредственное участие в процессах биосинтеза, то снижение уровня

стероидных гормонов происходит к окончанию репродуктивного цикла животных.

К изучению вопроса экскреции физиологически активных веществ вместе с половыми продуктами следует подходить с учетом наступления массового нереста у моллюсков. В крымском побережье существует два четко выраженных пика размножения мидий: осенний и весенний [65]. При этом индикатором скорости созревания и развития мидий является температура воды. С повышением температуры воды до 8–9 °С начинается весеннее размножение мидий (50% мидий находятся в состоянии нереста). В мае наступает фаза покоя. Многолетние исследования показали, что осенний пик размножения начинается в конце августа и продолжается в сентябре — середине октября. К концу октября в гонадах моллюсков начинается посленерестовая перестройка [65]. Известно, что в весенний и осенний периоды в нересте участвует от 55% до 80% моллюсков, а в зимний — только 47%. Осенний пик размножения более продолжителен, чем весенний. Зимой наблюдается период покоя с небольшой вспышкой размножения в декабре.

Для расчета экскреции тестостерона или эстрадиола, а также ЖК или элементов может быть несколько подходов. Первый подход заключается в изучении количественных закономерностей экскреции. Для выяснения количественных закономерностей прижизненной экскреции тестостерона (ЖК) можно сопоставить размер тела моллюсков с интенсивностью энергетического обмена. Существует параболическая зависимость между интенсивностью обмена и основными жизненными функциями беспозвоночных [60]. Интенсивность обмена в свою очередь отражается в интенсивности других функций, в частности экскреции органических и неорганических метаболитов. Поэтому интенсивность экскреции зависит от веса тела. Скорость выделения тестостерона или ЖК можно выразить уравнением параболы (1.1):

$$T = b W^k, \quad (1.1)$$

где  $T$  — скорость выделения тестостерона (ЖК);  $W$  — сухая масса мягких тканей, г;  $b$  и  $k$  — коэффициенты, причем  $k < 1$ , т. е. интенсивность экскреции повышается с уменьшением размера животного.

Значения коэффициентов  $k$  для разных групп животных различны и находятся в пределах 0,56–0,86 [60]. Для тестостерона или ЖК такие коэффициенты не определены, так как исследования зависимости сухого веса мидии, выраженного в граммах, от экскреции тестостерона (ЖК) в сутки,  $\text{мг} \cdot \text{сутки}^{-1}$ , в лабораторных условиях провести невозможно из-за, например, присутствия тестостерона или ЖК, выделяемых позвоночными животными, в том числе человеком.

С другой стороны, зависимость линейных размеров моллюсков ( $L$  — длина раковины, мм) от их индивидуального возраста ( $T$  — годы) хорошо описывается экспоненциальной функцией [60]:

$$L = 35,74 + 43,84 \lg T \quad (1.2)$$

Тогда концентрация тестостерона (ЖК) в мидии в зависимости от времени можно аппроксимировать уравнением:

$$y = a + b \cdot \lg x,$$

где  $y$  — содержание тестостерона (ЖК),  $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ ;  $x$  — индивидуальный возраст моллюска, годы;  $a$  — свободный коэффициент уравнения, соответствующий концентрации стероида (ЖК) в моллюске возрастом 1 год;  $b$  — коэффициент, показывающий, с какой скоростью идет накопление гормонов (ЖК) моллюском во времени. Нахождение коэффициентов  $a$  и  $b$  представляет собой сложную методическую задачу, так как эндогенное либо экзогенное происхождение стероидов в организме беспозвоночных еще не доказано.

**Заключение по 1 главе.** Оценивая работы, выполненные другими авторами в данном направлении, можно выделить несколько научных проблем, которые пока не удалось разрешить. Во-первых, не изучено содержание стероидных гормонов, жирных кислот, макро- и микроэлементов в сперме и яйцеклетках мидии *M. galloprovincialis*. Не рассмотрены процессы экскреции БАВ и

микроэлементов вместе с половыми продуктами мидий. Еще не исследован ЖК-состав трохофор мидии *M. galloprovincialis*, а также влияние поллютантов органического происхождения на изменение ЖК-состава личинок мидий. До сих пор отсутствовали попытки объяснения связи стероидных гормонов, участвующих в размножении, с ЖК и элементами по стадиям репродуктивного цикла. Практически не разработаны технологии получения функциональных продуктов на основе гонад и половых продуктов мидии *M. galloprovincialis*. Решению этих вопросов посвящена данная диссертация.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Объект исследований

Объект исследований — двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, культивируемый у берегов Крыма (Чёрное море) (рис. 2.1).



Рисунок 2.1 — Объект исследования — двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis*, культивируемый у берегов Крыма (Чёрное море)

Материал для исследований отбирали на двух участках Крымского побережья Чёрного моря в условно чистой акватории б. Ласпи (44.42° N, 33.70° E) и Карантинной бухте г. Севастополя (44.61° N, 33.49° E) (рис. 2.2). Основную долю исследуемых мидий составляли особи размером 50–60 мм. Моллюсков отбирали водолазным способом с глубины 2–3 м 1 раз в квартал и во время их массового нереста в период с 2012 по 2020 гг. Всего было обработано более 1000 экземпляров мидий. Работа выполнена с соблюдением биоэтических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях, с участием мидий, соответствовали этическим стандартам и утвержденным правовыми актами РФ, а также принципам Базельской декларации.



Рисунок 2.2 — Карта-схема станций отбора проб мидий в Чёрном море.  
Станции: 1 — Карантинная бухта, 2 — бухта Ласпи

## 2.2 Определение общего тестостерона и эстрадиола в гонадах и половых продуктах мидии *Mytilus galloprovincialis*

Для количественного определения общего тестостерона и эстрадиола отбор проб проводили 1 раз в квартал в период с 2012 по 2014 гг. Моллюсков с длиной раковин 50–60 мм отбирали с глубины 2 м на марихозьястве, расположенном в б. Ласпи. Всего было проанализировано 270 мидий.

У очищенных от обрастаний и биоотложений мидий или извлекали гонады, или получали половые продукты. Половую принадлежность и стадии репродуктивного цикла мидий определяли на мазке гонад с помощью микроскопа, основываясь на анализе гистологических препаратов [37]. Гонады разделяли по стадиям репродуктивного цикла таким образом, чтобы на одной репродуктивной стадии находилось пять параллельных групп, в каждую из которых входили гонады одного моллюска. У моллюсков, находящихся на преднерестовой стадии развития, путем температурной стимуляции вызывали нерест и отбирали половые продукты. Для сбора половых продуктов не вскрытые, очищенные от обрастаний и биоотложений мидии, выловленные во время

массового нереста, рассаживали по 1 экз. макушкой вниз в стаканы объемом 0,5 л, заливали фильтрованной морской водой, нагретой до 25 °С, таким образом, чтобы покрыть водой верхнюю часть створок (рисунок 2.3).



Рисунок 2.3 — Сбор половых продуктов самок и самцов мидии *Mytilus galloprovincialis*

Яйцеклетки в процессе нереста оседали на дно в виде оранжевого осадка. Сперматозоиды образовывали в воде белое облако (рисунок 2.4).



А



Б

Рисунок 2.4 — Сбор яйцеклеток (А) и сперматозоидов (Б) нерестящейся мидии *Mytilus galloprovincialis*

Половые продукты отфильтровывали от биоотложений на газ-сите с размером пор 40 мкм. Воду над осадком яйцеклеток сливали, взвесь сперматозоидов центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. В результате получали чистый однородный осадок яйцеклеток и сперматозоидов [17]. Гонады и отобранную дозатором суспензию половых продуктов от каждой особи гомогенизировали в фарфоровой ступке с добавлением минимального количества этанола (не более 10% от объема гонад или суспензии половых продуктов). Низкая концентрация этанола в пробе (от 5% до 10%) существенно не влияла на результат иммуноферментного анализа [160, 178, 221].

Гомогенизированные гонады и половые продукты центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин. Пробы хранили в течение суток при температуре от 4 °С до 8 °С, так как эстрадиол стабилен именно при этих температурах [31].

Сухую массу гонад и половых продуктов определяли на аналитических весах с точностью взвешивания до 0,0001 г. после высушивания 1 мл взвеси гомогенизированных гонад, сперматозоидов и яйцеклеток при температуре 105 °С. Длину раковины моллюсков измеряли штангенциркулем типа ШЦЦ с цифровой индикацией и шагом дискретности цифрового отсчетного устройства 0,01 мм.

Концентрацию общего тестостерона и эстрадиола в гонадах и половых продуктах определяли методом иммуноферментного анализа с помощью ИФА-ридера (фотометра) и набора реагентов: «Testosterone ELISA EIA-1559» и «Estradiol ELISA EIA-2693». Набор реагентов «Testosterone ELISA» («DRG Instruments GmbH», Германия) применяют в иммуноферментном анализе для количественного определения концентрации тестостерона в исследуемых образцах в диапазоне от 0,08 до 16,00 нг·мл<sup>-1</sup> с пределом детектирования 0,022 нг·мл<sup>-1</sup>. В основе метода происходит избирательное конкурентное связывание некоторых веществ с исследуемым соединением, при этом нет различия между анализируемым веществом и его меченым аналогом, добавленным извне. Чем больше в пробе определяемого вещества, тем меньше связывается меченое вещество.

В ходе определения присутствующий в пробе тестостерон конкурировал с меченым пероксидазой хрена тестостероном (конъюгатом) за связывание с моноклиными мышинными антителами, нанесенными на поверхность полистироловых планшетов. Количество связанного конъюгата было обратно пропорционально концентрации тестостерона в исследуемом образце. Не связанный с антителами конъюгат удаляли промывкой. Добавление в промытые лунки 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (субстрата) и стоп-реагента приводило к образованию окрашенного продукта. Окраска была обратно пропорциональна концентрации тестостерона в пробе. Интенсивность окраски (оптическую плотность) калибраторов и образцов измеряли фотометрически с помощью ИФА анализатора «Chorus» (фирма-изготовитель «Diesse Diagnostica Senese SpA», Италия). Анализатор «Chorus» достаточно прост в обращении при проведении иммунологических методов ELISA, которые характеризуются высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Численное значение концентрации вычисляли с помощью калибровочной кривой, построенной по сывороточным калибраторам с известным содержанием тестостерона. В общем виде реакция антиген-антитело может быть описана простой схемой:  $[АГ]+[АГ] \leftrightarrow [АТАГ]$ .

Основные этапы анализа заключались в следующем. В каждую лунку планшета из полистирола с нанесенными на его поверхность мышинными антителами вносили по 25 мкл исследуемого образца, стандартного образца с концентрациями общего тестостерона 0; 0,2; 0,5; 1; 2; 6; 16 нг·мл<sup>-1</sup> (1 нг·мл<sup>-1</sup> = 3,467 нмоль·л<sup>-1</sup>) и контрольного образца. Во все лунки добавляли по 200 мкл меченных пероксидазой хрена антител. Инкубировали 60 мин при комнатной температуре и отмывали промывочным раствором. Добавляли в каждую лунку по 200 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента (0,5 М серной кислоты). Интенсивность окраски раствора была обратно пропорциональна концентрации общего тестостерона, содержащегося в анализируемом образце. Учет результатов

проводили на ИФА-ридере на длине волны  $450 \pm 10$  нм. Относительная погрешность измерения оптической плотности не превышала  $\pm 2,5\%$ .

Набор «Estradiol ELISA» («DRG Instruments GmbH», Германия) предназначен для количественного определения содержания общего эстрадиола методом иммуноферментного анализа на стрипованных полистироловых планшетах в диапазоне от  $12,35 \text{ пг}\cdot\text{мл}^{-1}$  до  $1000 \text{ пг}\cdot\text{мл}^{-1}$  с чувствительностью метода  $4,45 \text{ пг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Принцип метода аналогичен тест-системе «Testosterone ELISA» и основан на конкурентном связывании эстрадиола из измеряемой пробы и эстрадиола, меченного пероксидазой хрена, со специфичными к эстрадиолу антителами мыши, нанесенных на поверхности лунок полистиролового планшета. Для определения эстрадиола использовали стандартный образец с концентрациями эстрадиола 0; 25; 100; 250; 500; 1000; 2000  $\text{пг}\cdot\text{мл}^{-1}$  ( $1 \text{ пг}\cdot\text{мл}^{-1} = 3,467 \text{ пмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ ) и контрольный образец. Полученную концентрацию эстрадиола рассчитывали на 1 г сухой массы и пересчитывали в  $\text{пг}\cdot\text{г}^{-1}$  сухой массы гонад (половых продуктов).

### **2.3 Определение ЖК-состава гонад и половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis***

Для исследования содержания жирных кислот в гонадах и половых продуктах мидий отбирали по 250–270 экз. свежельовленных моллюсков с длиной раковины 5–6 см и в возрасте 1,5–2 года со времени оседания личинок на коллекторы. Моллюски находились преимущественно на преднерестовой стадии развития, однако, в каждой выборке встречались мидии, гонады которых находились на разных стадиях репродуктивного цикла.

Яйцеклетки и сперматозоиды получали по методике, описанной в разделе 2.2. Яйцеклетки собирали с помощью дозатора и переносили в пробирки, сперматозоиды отделяли центрифугированием при 1500 об/мин до их полного осаждения, верхний водный слой декантировали. Сразу после отбора проб гонад и половых продуктов проводили экстракцию общих липидов.

Подготовку образцов для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) из тканей начинали с экстракции липидов. Для этого гонады и половые продукты от каждой мидии тщательно растирали в ступке с 5 мл смеси этанол : хлороформ (1 : 1) до однородной массы в течение 10 мин. Гомогенат с двукратным объемом дистиллированной воды центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Капилляром отбирали нижний хлороформный слой. Хлороформную фракцию упаривали на роторном испарителе, к остатку добавляли 5 мл свежеприготовленного раствора щелочи в метаноле (10 мл 3 н. раствора NaOH и 90 мл 90% метанола). Полученный раствор кипятили с обратным холодильником до полного омыления липидов в течение 90 мин.

После остывания к раствору добавляли несколько капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина, экстрагировали три раза гексаном порциями по 5 мл, гексановую фракцию «отбрасывали». К окрашенному щелочному раствору добавляли несколько капель 6 н. соляной кислоты и три раза экстрагировали гексаном порциями по 5 мл. Отбирали гексановый слой. После упаривания гексана на роторном испарителе при температуре 30–35 °С к остатку добавляли 5 мл свежеприготовленного хлористого водорода в метаноле. Смесь кипятили 90 мин с обратным холодильником и после охлаждения трижды (по 5 мл) экстрагировали гексаном. Отфильтрованную через беззольный фильтр гексановую фракцию упаривали на роторном испарителе, продували аргоном и хранили в морозильной камере не более суток. Непосредственно перед анализом МЭЖК растворяли в 0,5 мл перегнанного гексана. Для лучшего разделения компонентов на хроматографической колонке МЭЖК из сперматозоидов перед вводом в испаритель хроматографа разбавляли в 50 раз, а из яйцеклеток — в 100 раз.

Идентификацию МЭЖК проводили в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ с помощью газового хроматографа «Кристалл 5000» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия, Йошкар-Ола) с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором и капиллярной колонкой «DB-5ms UltraInert» («Agilent Technologies») длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной

пленки фазы 0,25 мкм в режиме ионизации электронным ударом 70 эВ. Газ носитель — гелий, скорость потока — 1 мл·мин<sup>-1</sup>. Ввод пробы осуществляли без деления потока, температура инжектора составляла 280 °С. Начальная температура колонки — 60 °С, задержка — 1 мин, промежуточная температура (1) — 180 °С, скорость подъема — 20 °С·мин<sup>-1</sup>, промежуточная температура (2) — 290 °С, скорость подъема — 5 °С·мин<sup>-1</sup>, конечная температура — 325 °С, скорость подъема — 5 °С·мин<sup>-1</sup>, задержка — 10 мин. Объем вводимой пробы — 1 мкл. Детектирование МЭЖК проводили по полному ионному току [64]. Идентификацию ЖК осуществляли, сравнивая масс-спектры МЭЖК с масс-спектрами библиотеки «NIST 14» Национального Института Стандартов и Технологий США с высокой степенью совпадения, а также со спектрами смеси эфиров жирных кислот «Supelco 37 component FAME mix». Относительное содержание индивидуальных ЖК определяли в процентах от общего содержания идентифицированных с высокой степенью совпадения с библиотечными значениями ЖК в исследуемом образце.

#### **2.4 Определение элементного состава гонад, половых продуктов и личинок мидии *Mytilus galloprovincialis***

Мидий, отобранных в весенний сезон 2019 г. при температуре воды в море 8 °С на глубине 6 м с коллекторов мидийной фермы в Карантинной бухте, визуально разделяли по цвету створок. Длина раковин черных и коричневых цветовых морф мидий варьировала в диапазоне от 6,5 до 7,5 см. Пол моллюсков и стадию их репродуктивного цикла определяли путем изучения гонадных мазков под микроскопом [65, 195]. Моллюски находились преимущественно на преднерестовой стадии развития. Биологическая повторность (количество вариантов одного и того же опыта) — пятикратная. Аналитическая (количество анализов, взятых с одного образца) — трехкратная. Всего было проанализировано 150 образцов мидий: 5 гонад самцов и 5 гонад самок гонад черной и коричневой морфы, половые продукты, полученные от 5 самок и 5 самцов черных и

коричневых цветковых морф мидий, а также их личинки. Погрешность трехкратных измерений макро- и микроэлементов в каждом образце не превышала допустимых значений.

**Пробоподготовка.** После механической очистки раковин мидий от обрастаний, моллюсков тщательно промывали в чистой фильтрованной морской воде таким образом, чтобы избежать очищения пищеварительных трактов, поскольку это могло бы привести к неточным результатам измерений из-за частичного удаления элементов из мягких тканей [88, 153].

Выстилающие обе створки гонады мидий отделяли с использованием пластмассового скальпеля и промокали фильтровальной бумагой, предварительно вымоченной в деионизированной воде и высушенной.

Яйцеклетки и сперматозоиды получали по методике, описанной в разделе 2.2. Яйцеклетки собирали с помощью дозатора и переносили в пробирки, сперматозоиды отделяли центрифугированием при 1500 об/мин до их полного осаждения, верхний водный слой декантировали.

Биомассу личинок, полученную на третьи сутки эксперимента, отделяли от воды с помощью фильтра с размером пор 84 мкм и трехкратно промывали деионизированной водой.

Образцы гонад, половых продуктов и личинок сушили до постоянной массы в сушильном шкафу при 105 °С и переносили с помощью пластикового шпателя во фторопластовые пробирки для мокрого сжигания. Навески исследуемых образцов массой 100 мкг подвергали мокрому сжиганию с помощью 4 мл химически чистой азотной кислоты (от 63% до 65%), дополнительно очищенной двойной перегонкой без кипения в системе очистки кислот «DST-1000» («Saville», США). Фторопластовые пробирки с крышками, предназначенные для мокрого сжигания, содержащие образцы и аликвоты кислоты, выдерживали в автоклаве при 120 °С в течение двух часов. Растворенные образцы разбавляли деионизированной водой с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см, полученной в деионизаторе «Д-301» («Аквилон», Россия), так, чтобы разбавление было в пределах 1000–2000 мл·г<sup>-1</sup> (в пересчете на сухую массу).

**Подготовка к проведению измерений.** Мойку и сушку посуды проводили в помещении ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ. Стеклянную посуду подвергали стандартной процедуре очистки с последующей последовательной промывкой 2%-ным раствором азотной кислоты и деионизированной водой. Для приготовления 2%-ного раствора азотной кислоты в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> вносили около 500 см<sup>3</sup> деионизированной воды, добавляли 20 см<sup>3</sup> азотной кислоты, доводя до метки деионизированной водой с последующим перемешиванием.

Для приготовления стандартных растворов применяли многоэлементный стандарт IV-ICPMS-71A-C («Inorganic Ventures», США, 10 мг·л<sup>-1</sup>). Точность анализа ИСП-МС была верифицирована измерениями концентраций элементов в сертифицированном европейском стандартном материале «ERM®-CE278k» (ткани мидии *M. edulis*, n=5), изготовленном в Институте стандартных материалов и измерений (Бельгия). Пробы сертифицированного стандартного образца растворяли в сверхчистой азотной кислоте и разбавляли деионизированной водой по приведенной выше процедуре. Средние значения измерений содержания элементов и их неопределенности при 95%-ном доверительном интервале приведены в табл. 2.1 вместе с сертифицированными данными.

Таблица 2.1 — Значения концентраций микроэлементов в стандартном образце «ERM®-CE278k»: среднее ± неопределенность при 95%-ном доверительном интервале

Элемент	Сертифицированное (мкг·г <sup>-1</sup> сух.)	Полученное (мкг·г <sup>-1</sup> сух., при n=5)
As	6,7 ± 0,4	5,7 ± 1,1
Cd	0,336 ± 0,025	0,37 ± 0,18
Co	0,21 ± 0,07	0,21 ± 0,07
Cr	0,73 ± 0,22	0,95 ± 0,55
Cu	5,98 ± 0,27	5,9 ± 3,6

Продолжение таблицы 2.1

Элемент	Сертифицированное (мкг·г <sup>-1</sup> сух.)	Полученное (мкг·г <sup>-1</sup> сух., при n = 5)
Fe	161,0 ± 8,0	186,0 ± 8,3
Hg	0,071 ± 0,007	0,2 ± 0,3
Mn	4,88 ± 0,24	5,1 ± 1,4
Ni	0,69 ± 0,15	0,8 ± 0,3
Pb	2,18 ± 0,18	2,28 ± 0,55
Rb	2,46 ± 0,16	2,23 ± 0,14
Se	1,62 ± 0,12	1,65 ± 0,34
Sr	19,0 ± 1,2	18,9 ± 3,3
Zn	71,0 ± 4,0	65,0 ± 6,0

Для определения макроэлементов высушенные образцы гонад, половых продуктов и личинок измельчали в ступке до однородной массы и просеивали через сито.

**Анализ макроэлементов** проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа типа «SU3500» («HITACHI High-Technologies Corporation», Япония). Диапазон измерений массовой доли элементов — от 0,5% до 100%. Пределы допускаемой относительной погрешности измерений массовой доли элементов в диапазонах составляют: от 0,5% до 1,5% — 20%; от 1,5% до 10% — 15%; от 10% до 20% — 10%; от 20% до 100% — 5%.

**Количественный элементный анализ микроэлементов** проводили с помощью масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) «Plasma Quant MS Elite» («Analytik Jena», Германия), с параметрами, приведенными в работе [153]. Для микроэлементного анализа всю лабораторную посуду подвергали стандартной процедуре очистки путем выдерживания в течение двух суток в 2% растворе азотной кислоты, очищенной перегонкой без кипения в установке типа «DST-1000» («Saville», США), и последующей промывки деионизированной водой. Биологические пробы минерализовали путем мокрого сжигания в очищенной 65% азотной кислоте во фторопластовых пробирках и затем разбавляли деионизированной водой, так чтобы разбавление

было в пределах 1000–2000 мл·г<sup>-1</sup> (в пересчете на сухую массу). Калибровочные кривые строили по стандартным растворам, полученным путем разбавления деионизированной водой многоэлементного стандарта IV-ICPMS-71A-C («Inorganic Ventures», США, 10 мг·л<sup>-1</sup>). Коэффициенты R<sup>2</sup> линейной регрессии для всех калибровочных графиков были не менее 0,998.

Общие характеристики прибора ИСП-МС и используемые установки сканирования представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 — Параметры прибора ИСП-МС и установки сканирования

Параметры		Значение
Параметры потока		л·мин <sup>-1</sup>
	Поток плазмы	8,5
	Вспомогательный поток	1,00
	Поток в распылителе	0,97
Выравнивание факела		
	Глубина отбора	8,0 мм
Ионная оптика		Вольт
	Первая экстракционная линза	-450
	Вторая экстракционная линза	-411
	Третья экстракционная линза	-413
	Угловая линза	-410
	Зеркальная линза влево	45
	Зеркальная линза вправо	43
	Зеркальная линза внизу	38
	Входящая линза	5
	Коррекция краевого эффекта	-6,0
	Входная пластина	-53
	Коррекция на полюсах	-2,0
Другие		
	Мощность ВЧ генератора	1,45 кВт
	Скорость перистальтич. насоса	20 об/мин
	Задержка отбора пробы	40 с
Установки сканирования		
	Режим сканирования	Скачкообразный
	Интервал	Точный
	Количество точек на пик	1
	Количество сканирований за повтор	5
	Количество повторов на пробу	5
	Время пребывания	10 мс.
Коррекция ослабления		
	Уровень нулевое-среднее	40–66
	Уровень среднее-высокое	120

Анализ проводили с включенным или выключенным интерфейсом столкновительных реакций (ИСР). При включенном режиме ИСР в качестве скиммер-газа использовали газообразный водород со скоростью 40 мл·мин<sup>-1</sup>.

ИСР устраняет большинство полиатомных интерференций ценой уменьшения чувствительности и таким образом повышает линейность калибровочных кривых и точность определения в тех случаях, когда эти интерференции присутствуют. В режиме с включенным ИСР соответствующие коэффициенты R<sup>2</sup> были выше.

Для устранения эффекта матрицы [71, 200] в качестве внутреннего стандарта выбраны изотопы шести элементов: <sup>6</sup>Li, <sup>45</sup>Sc, <sup>113,115</sup>In, <sup>89</sup>Y, <sup>159</sup>Tb, <sup>209</sup>Pb с концентрациями 20 мкг·л<sup>-1</sup> («Bruker Daltonics Chemical Analysis», США). В предварительном анализе проб эти элементы были на нулевом уровне в пределах ошибки измерений.

## **2.5 Определение хлорорганических соединений в мидии *Mytilus galloprovincialis* и ее личинках**

В работе проведены исследования концентрации хлорорганических соединений (ХОС) в воде, гонадах, яйцеклетках самок и сперматозоидах самцов одноразмерных мидий, собранных в апреле и июне 2016 г. с коллекторов мидийно-устричной фермы в Карантинной бухте. Размер створок мидий составлял в среднем 70 мм. Всего исследовано около 150 экз. моллюсков: по 10 мидий на каждой стадии репродуктивного цикла и половые продукты, отобранные у 10 самок и 10 самцов.

У мидий отбирали гонады и распределяли по стадиям репродуктивного цикла [37] таким образом, чтобы на каждой стадии репродуктивного цикла находилось не менее 10 гонад. Гонады на 5 стадии исследовали до и после нереста в десяти повторностях. Яйцеклетки и сперматозоиды получали по методике, описанной в разделе 2.2. Объединяли сперму, полученную от десяти самцов, и яйцеклетки, полученные от десяти самок. Полученная выборка

включала по 10 гонад моллюсков, находящихся на разных стадиях репродуктивного цикла, 10 гонад моллюсков после нереста, сперматозоиды, отобранные у 10 самцов, и яйцеклетки от 10 самок.

Яйцеклетки отбирали дозатором со дна сосуда, в котором проходил нерест, и фиксировали хлороформом, который затем отгоняли на роторном испарителе. Маслянистый осадок, оставшийся в колбе, высушивали при температуре 110 °С до постоянной массы. Сперму, образующую белое облако в сосуде, где проходил нерест, фиксировали хлороформом. Хлороформенный слой отмывали водой, растворитель отгоняли на роторном испарителе и остаток высушивали. Гонады самок и самцов растирали в ступке, взвешивали и высушивали при 110 °С до постоянной массы.

В высушенных пробах определяли содержание ДДТ и его метаболитов ДДЭ и ДДД, а также шести конгенов ПХБ 11 [106]: трихлорбифенила (ХБ) 28; тетраХБ 52; пентаХБ 101, гексаХБ 138, 153 и гептаХБ 180. Следуя известной методике [45], ХОС выделяли из гомогенизированных тканей смесью гексана и ацетона (3 : 1), очищали экстракты от мешающих соединений на колонке с импрегнированной концентрированной серной кислотой и анализировали на газовом хроматографе хроматограф «Кристалл 5000» с детектором электронного захвата [39] и капиллярной колонкой длиной 25 м, внутренним диаметром 25 мкм, с нанесённым слоем 0,45 мкм стационарной фазы «СР Sil-8СВ». Полученные результаты представлены в  $\text{нг} \cdot \text{г}^{-1}$  сухой массы. Массовую долю липидов в пробах определяли экстракционно-весовым методом [12].

Для количественных расчётов использовали метод абсолютной градуировки, при этом применяли стандартные растворы 6 конгенов ПХБ фирмы «Supelco» и стандартные растворы хлорпестицидов «ХОП-5», которые включают ДДТ и его метаболиты. Полученные результаты представлены в  $\text{нг} \cdot \text{г}^{-1}$  сухой массы. Ошибка определения ХОС не превышала 20%. Коэффициенты накопления ( $K_n$ ) ХОС в гонадах мидий рассчитывали как отношение концентрации ХОС в мидиях к концентрации соответствующего ХОС в воде:  $K_n = C_{\text{ХОСМ}}/C_{\text{ХОСВ}}$ .

**Получение личинок мидии.** Для определения состава жирных кислот (ЖК-состава) трохофор мидий, выращенных в условиях загрязненности полихлорбифенилами (ПХБ), проводили нерест и оплодотворение моллюсков в лабораторных условиях. Для очистки пищеварительного тракта 150 экз. мидий 4 часа выдерживали в профильтрованной морской воде, отобранной батометром в акватории Карантинной бухты.

Яйцеклетки и сперматозоиды получали по методике, описанной в разделе 2.2. После выделения половых продуктов моллюсков удаляли из стаканов. Полученные растворы с яйцеклетками объединяли и переносили в трехлитровую ёмкость. Отдельно в трехлитровую ёмкость собирали растворы со спермой. Далее к раствору с яйцеклетками добавляли 10 мл раствора со спермой мидий. Поскольку процесс оплодотворения происходит быстро [65], воду с оплодотворенными яйцеклетками через три минуты разделили на пять частей по 0,5 л и поместили в 5 отдельных реакторов. Объем каждого реактора составлял 1 л.

В три реактора добавили раствор смеси ПХБ в ацетоне («Ароклор 1254», «Supelco», США). Концентрация ПХБ в воде реакторов, воздействующая на личинок, составила 0,1; 1 и 10 мкг·л<sup>-1</sup>. В четвертый реактор добавили растворитель ацетон в той же концентрации, что и в рабочих реакторах. Пятый реактор был контрольным. Эксперимент проводили в трех повторностях. В районе фермы в период отбора мидий суммарная концентрация ПХБ в воде не превышала 3 нг·л<sup>-1</sup>, что соответствовало среднему значению для открытых районов Чёрного моря [28].

Температура в реакторах для выращивания личинок составляла  $20 \pm 2$  °С. Освещение в реакторах обеспечивали лампами дневного света и естественным освещением. Комбинированная освещенность реакторов, измеренная люксметром «Ю-116», не превышала 750 лк. Личинок мидии выращивали трое суток, пока они находились на пассивном питании. На этой стадии только начинает происходить формирование пищеварительной системы и увеличение объема полости тела [65].

Состав жирных кислот (ЖК) суммарных липидов исследовали в биомассе личинок, полученных на третьи сутки эксперимента. Для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) личинки отделяли от воды фильтрованием через фильтр с размером пор 84 мкм. Личинки тщательно смывали с фильтра смесью этанол : хлороформ (1 : 1) несколькими порциями по 5 мл. Дальнейшую подготовку проб проводили по методике, описанной в разделе 2.3.

Определение МЭЖК проводили в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ методом хромато-масс-спектрометрии с помощью хроматографа «Кристалл 5000», оснащенного квадрупольным масс-спектрометрическим детектором.

## 2.6 Статистическая обработка результатов

Концентрации общего тестостерона и эстрадиола в половых продуктах и для каждой стадии репродуктивного цикла определяли в десяти повторностях. Коэффициент вариации концентрации половых гормонов не превышал 10,53%. В предположении нормальности распределения результатов измерений оценка достоверности различий концентраций гормонов у самцов и самок мидий на разных стадиях репродуктивного цикла проводили путем расчета t-критериев Стьюдента, которые находились в диапазоне от 25 до 520, и сравнения с табличными критическими значениями t-критерия для девяти степеней свободы. Различия являлись достоверными с вероятностью не менее 0,999.

Данные по относительному содержанию ЖК в пробах анализировали с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Колмогорова-Смирнова для пар независимых выборок. Различия между средними в выборках считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  и сомнительными при  $0,05 \leq p < 0,10$ . Измерения проводили в трех повторностях.

При исследовании концентрации конгенов ПХБ,  $\Sigma$ ДДТ, общих липидов в воде, гонадах, яйцеклетках самок и сперматозоидах самцов мидий различия

между средними в выборках считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Измерения проводили в 16 повторностях.

Для статистического анализа состава жирных кислот в трохофорах мидий, выращенных в условиях загрязненности полихлорбифенилами, эксперимент проводили в пяти повторностях и использовали пакет функций «Statistical Toolbox», интегрированный в программу «Matlab» (версия 8.2). Статистически значимые различия между выборками устанавливали согласно однофакторному дисперсионному анализу (число степеней свободы  $df = 4$ ) и попарному апостериорному сравнению по критерию Тьюки-Крамера.

Определение макро- и микроэлементов проводили в пяти биологических и трех аналитических повторностях. Статистические различия оценивали в программе «PAST 4.01», применяя однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный попарный анализ по критерию Тьюки. Различия между средними значениями в выборках считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты представлены как среднее  $\pm$  доверительный интервал с вероятностью 95% ( $n = 15$ , где  $n$  — количество измерений).

### ГЛАВА 3 СОДЕРЖАНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

#### 3.1 Общий тестостерон и эстрадиол в гонадах и половых продуктах мидий на разных стадиях репродуктивного цикла

Несмотря на широкое изучение репродуктивной биологии мидии *M. galloprovincialis*, по-прежнему мало внимания уделяют комплексной оценке физиологических особенностей этих процессов у моллюсков. Чаще всего авторы ограничиваются изучением соматических и генеративных тканей мидий или их яйцеклеток [237], не принимая во внимания процессы, происходящие во время сперматогенеза, осуществляемого под регулирующим воздействием половых гормонов. Ранее не рассматривались весьма важные показатели роста и развития мидий: характер изменений величин концентраций половых стероидов в период репродуктивного цикла и в половых продуктах, а также экскреция тестостерона и эстрадиола в водную среду во время массового нереста.

Данные по содержанию тестостерона и эстрадиола в гонадах и половых продуктах мидии в пересчете на 1 г сухой массы приведены в таблице 3.1.

**Общий тестостерон.** Концентрация тестостерона у самцов мидии *M. galloprovincialis* в среднем в 3 раза выше, чем у самок. В сперматозоидах концентрация тестостерона превышает его концентрацию в гонадах в среднем более чем в пять раз и на три порядка выше, чем в яйцеклетках. Максимальная концентрация тестостерона у самцов и самок наблюдается на первой и второй стадиях репродуктивного цикла, затем снижается до минимума к третьей стадии и начинает возрастать к периоду нереста. Перед нерестом на пятой стадии репродуктивного цикла уровень общего тестостерона у самцов и у самок статистически достоверно не различается. Это вызвано тем, что в гонадах самцов в период репродуктивного цикла тестостерон стимулирует основной обмен, синтез белков, обеспечивая, таким образом, мощный анаболический эффект [68].

После нереста концентрация тестостерона в гонадах снижается, а к первой стадии зрелости резко возрастает.

Таблица 3.1 — Концентрация стероидных гормонов в гонадах и половых продуктах мидии *Mytilus galloprovincialis* в зависимости от пола и стадии репродуктивного цикла

Стадии репродуктивного цикла, половые продукты	Содержание стероидных гормонов, $\text{пг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух.}}$			
	Общий тестостерон		Эстрадиол	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
1	$7757,8 \pm 2315,2$	$2154,5 \pm 643,1$	$90,1 \pm 28,6$	$512,5 \pm 33,1$
2	$2453,1 \pm 1409,8$	$592,1 \pm 112,8$	$120,9 \pm 27,8$	$623,0 \pm 40,8$
3	$781,1 \pm 60,1$	$210,3 \pm 30,0$	$104,7 \pm 30,1$	$747,0 \pm 30,0$
4	$979,0 \pm 83,9$	$352,0 \pm 192,0$	$119,5 \pm 26,3$	$636,7 \pm 22,0$
5a	$975,1 \pm 464,3$	$859,0 \pm 116,1$	$132,2 \pm 34,3$	$529,0 \pm 26,1$
5b	$692,2 \pm 115,4$	$144,2 \pm 14,4$	$110,64 \pm 20,4$	$501,8 \pm 34,4$
Яйцеклетки	н. п.	$10,1 \pm 4,8$	н. п.	$539,5 \pm 122,8$
Сперматозоиды	$14284,8 \pm 259,2$	н. п.	$194,4 \pm 59,2$	н. п.

Примечание: 5a — гонады перед нерестом; 5b — гонады после нереста; н. п. — не применимо;  $\pm$  — ошибка среднего.

**Эстрадиол.** В гонадах самок минимальная концентрация эстрадиола отмечена на пятой стадии репродуктивного цикла после нереста и статистически достоверно не отличалась от первой стадии, а максимальная — на третьей стадии репродуктивного цикла. У самцов минимальную концентрацию эстрадиола наблюдали на первой стадии репродуктивного цикла, а максимальную — на пятой стадии перед нерестом. В целом, уровень эстрадиола в гонадах самцов в 5 раз ниже, чем у самок. У мидии *M. galloprovincialis* средняя концентрация эстрадиола в яйцеклетках в 3 раза выше, чем в сперматозоидах, что подтверждает общее положение, что эстрадиол по своей природе является преимущественно гормоном самок.

Изменение уровня стероидных гормонов в гонадах мидии имеет сезонный цикл [195]. В целом, общая концентрация эстрадиола в гонадах самцов значительно ниже, чем у самок. Скорее всего, это связано с высокими и низкими соматическими и генеративными приростами мидий [1]. Подобная тенденция отмечена у мидии, когда различают два периода максимального содержания аминокислот (с января по март и с июля по сентябрь), и два периода их минимальной концентрации (с апреля по май и с ноября по декабрь), что связано с циклами размножения моллюсков [11]. Следует отметить, что аминокислотный состав двустворчатых моллюсков, относящихся к одному типу, различается незначительно [172]. По-видимому, такое сходство касается и стероидных гормонов, т. е. веществ, поступающих в организм беспозвоночных главным образом из водной среды и вместе с пищей.

Ранее было установлено, что концентрация тестостерона в гонадах самок мидии *M. galloprovincialis* без разделения по стадиям репродуктивного цикла составляет  $0,6 \pm 0,04$  пмоль·г<sup>-1</sup> или  $172,8 \pm 1,52$  пг·г<sup>-1</sup>, а у самцов —  $0,3 \pm 0,04$  пмоль·г<sup>-1</sup> или  $86,4 \pm 11,52$  пг·г<sup>-1</sup>, т. е. в два раза меньше, чем у самок [21]. Стимулирующий эффект эстрадиола и тестостерона на оогенез и сперматогенез был показан на примере приморского гребешка [7, 8]. Для мидий известно активирующее влияние некоторых половых гормонов, в частности 17-β-эстрадиола, на глутатионпероксидазу и каталазу [24], что становится особенно важным в состоянии нереста моллюсков. Весенне-летний и осенне-зимний репродуктивные периоды мидий характеризуются завершением генеративного роста с последующим выметом основной массы половых продуктов. Из-за приостановки белкового синтеза содержание белка в гонадах уменьшается [68], а количество МНЖК и ПНЖК возрастает [155]. Следует отметить, что жир, как энергетический субстрат, у мидий используется крайне редко, в основном на начальном этапе формирования гонадотропной ткани. При этом максимальные значения концентрации тестостерона обнаружены в гонадах самцов на первой стадии репродуктивного цикла и в сперматозоидах [195]. Концентрации

эстрадиола в гонадах самок на протяжении цикла репродуктивного цикла и в яйцеклетках более стабильны, чем у самцов.

Принято считать, что стероиды поступают в организм моллюсков с пищей из водной среды [142]. В 70-х годах был проведен ряд исследований относительно стероидогенеза с использованием различных предшественников стероидов и обнаружением их метаболитов. Несколько исследований продемонстрировали способность двустворчатых моллюсков синтезировать половые стероиды из холестерина или прегненолона [169; 163; 164] (рисунок 3.1).

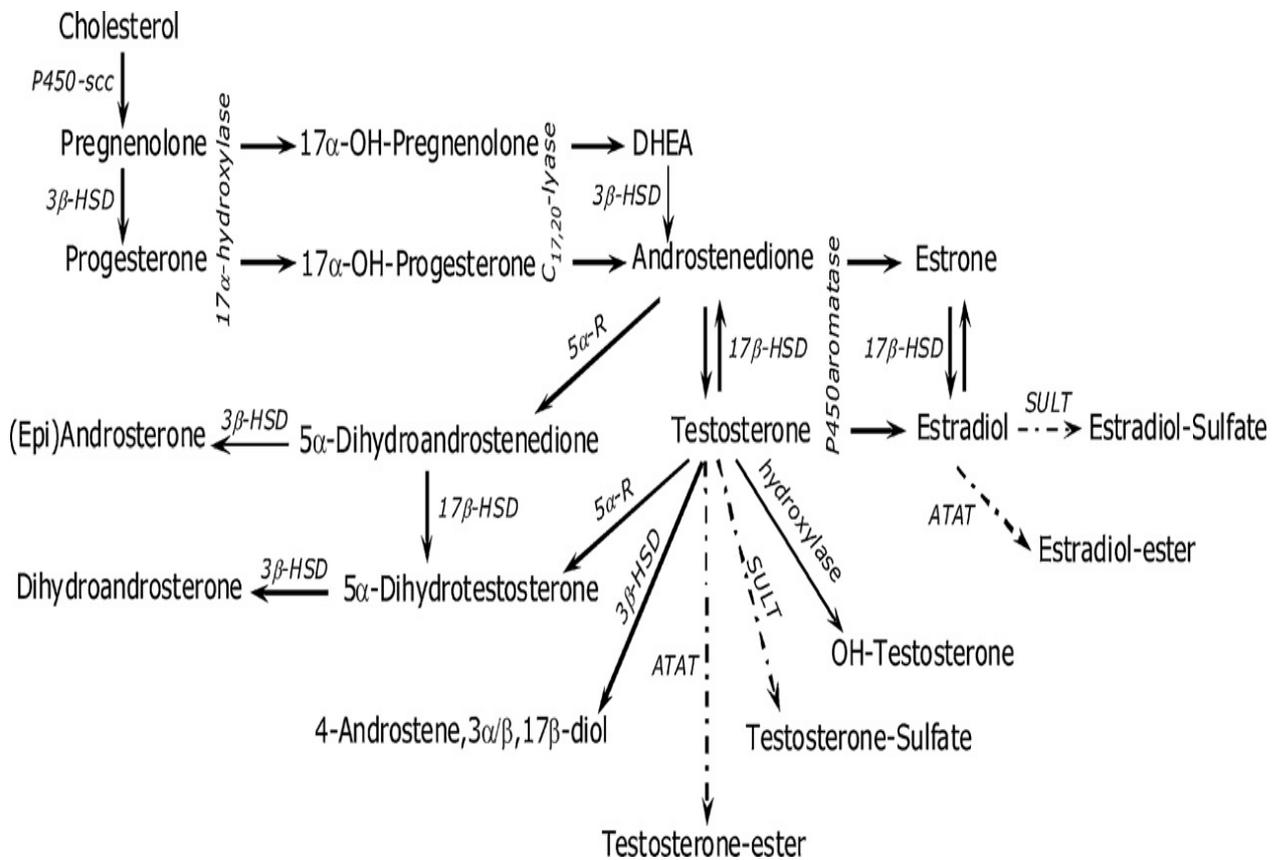


Рисунок 3.1 — Стероидогенные и метаболические пути, описанные у моллюсков путем измерения метаболизма меченых стероидов. P450-scc — расщепление боковой цепи P450; 3- или 17-HSD — 3- или 17-гидроксистероиддегидрогеназы; 5-R — 5-редуктаза; ATAT — ацил-КоА-ацилтрансфераза жирных кислот; SULT — сульфотрансфераза; DHEA — дигидроэпиандростерон; дигидроандростерон — 5-андростан-3,17-диол [115]

Представленная схема вызывает немало вопросов. Во-первых, двустворчатые моллюски не способны синтезировать холестерин [152], который, скорее всего, имеет экзогенное происхождение [115, 116, 117]. Во-вторых, присутствие фермента гидроксистероид дегидрогеназы (3 $\alpha$ -гидроксистероиддегидрогеназа, 3 $\alpha$ -HSD), необходимого для синтеза 3 $\alpha$ -андростандиола и обратимого превращения 3 $\alpha$ -андростандиола (5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -диол) в дигидротестостерон (ДГТ, 5 $\alpha$ -андростан-17 $\beta$ -ол-3-он). И наоборот, как и многих других ферментов, указанных на рисунке 3.1, у двустворчатых моллюсков не были функционально охарактеризованы, а кодирующие их гены не были найдены [115, 116, 117]. Или, например, ферменты цитохром P450 (цитохром P450-зависимая монооксигеназа, CYP), обнаруженные в пищеварительной железе моллюсков, проявляли активность в 10 раз ниже, чем у млекопитающих [174, 175, 233].

При исследовании концентрации тестостерона и эстрадиола в гонадах двустворчатого моллюска *Sinonovacula constricta*, обитающего в верхней сублиторали Желтого моря [139], методом иммуноферментного анализа установлено, что средняя концентрация общего тестостерона в гонадах самок и самцов *S. constricta* составляла 1870 пг·г<sup>-1</sup> и 8060 пг·г<sup>-1</sup>. В гонадах самок *S. constricta* максимальная концентрация «свободного» тестостерона обнаружена в июне — июле на 4 и 5 стадиях репродуктивного цикла, а минимальный уровень приходился на январь (3 стадия). В гонадах самок особей *S. constricta* минимальную концентрацию эстрадиола наблюдали в январе, а максимальную — в сентябре. По мере усиления репродуктивной активности уровень эстрадиола снижался, достигая своего минимального значения к концу периода размножения. При этом изменение концентрации эстрадиола в гонадах самок *S. constricta* происходил скачкообразно, а у самцов — практически оставался на одном уровне, достигая минимального значения к концу репродуктивного цикла.

Поскольку гормоны принимают непосредственное участие в процессах биосинтеза у беспозвоночных [225, 226, 227], можно предположить, что к окончанию репродуктивного цикла должно происходить снижение уровня

стероидных гормонов. Показано, что уровень эстрадиола влияет на процесс созревания гонад. Так, при исследовании в контрольном резервуаре мидии *M. galloprovincialis*, гонады которых находились на первой стадии репродуктивного цикла, в условиях даже с низкой экспозицией тестостерона ( $20 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) у 8 из 10 особей обнаружены зрелые гонады на 3–5 стадиях репродуктивного цикла [143]. Интересно, что при увеличении концентрации эстрадиола до  $200 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$  и  $2000 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$  подобного эффекта не наблюдалось, причем, чем выше была концентрация эстрадиола, тем меньше гонад переходило на 3–5 стадии развития.

В гонадах двустворчатых моллюсков установлена зависимость количественного содержания стероидных гормонов от стадии репродуктивного цикла и выдвинуты предположения о физиологической значимости стероидов [7, 8, 33, 34]. В исследованиях по изучению яблочной улитки *Pomacea paludosa*, обитающей во Флориде, уровень тестостерона повышался у самцов по сравнению с началом яйцекладки, а затем постепенно снижался в течение репродуктивной фазы организмов. У самок улиток уровень тестостерона оставался низким на протяжении всей репродуктивной фазы [166, 167]. Однако андрогенный сигнальный путь ни в улитках, ни в моллюсках не был идентифицирован.

Предположительно, хотя это еще не продемонстрировано, свободный тестостерон может высвобождаться из сложных эфиров под действием фермента эстеразы, когда организму требуется тестостерон [166, 167]. Результаты проведенных исследований не опровергают гипотезы о том, что тестостерон может синтезироваться моллюсками. Так как эндогенное производство тестостерона ни у мидий [225, 226, 227], ни у других моллюсков, например, у *Plyanassa obsoleta* [127, 128] еще не доказано окончательно, скорее всего, моллюски потребляют как тестостерон, так и эстрадиол из водной среды. Кроме того, исследования последних лет показали [243, 244], что тестостерон высоко метаболизируется, преобразуясь в сложные эфиры жирных кислот, по крайней мере, 25% от концентрации воздействия. Период полураспада этих сложных эфиров жирных кислот в моллюсках еще не установлен.

Эксперименты не показали значительного уменьшения эфиров тестостерона в тканях моллюсков даже после 10 дней исследований. Обнаружено лишь 4% снижение уровня эфиров тестостерона на 4 день наблюдений [127, 128]. Измерить в тканях моллюсков концентрацию «свободного» тестостерона отдельно от этерифицированного не представляется возможным. Такие манипуляции могут занять несколько недель, а лабораторные условия, в которых будут проводиться подобные измерения, будут содержать экзогенные источники стероидов [149, 225, 226, 227], которые, в свою очередь, будут легко преобразовываться моллюсками [225, 226, 227]. Не существует и «стерильных» лабораторных условий.

Все вышеперечисленные проблемы в интерпретации данных о содержании стероидов в моллюсков обсуждаются и в отношении эстрадиола. Большинство измерений тестостерона у моллюсков проводят с использованием наборов для иммуноферментного анализа «ELISA». Антитела, используемые в этих наборах, часто вступают во взаимодействие с дигидротестостероном. Так, реакция с дигидротестостероном в комплектах достигает 27%. Таким образом, при измерении тестостерона мы получаем смесь двух веществ: тестостерона и дигидротестостерона. С уверенностью можно сказать лишь то, что мидии поглощают тестостерон из воды, а затем этерифицируют тестостерон и его метаболиты с жирными кислотами. Как показывают исследования, сложноэфирная фракция состоит преимущественно из неэтерифицированного тестостерона (менее 10%), а также дигидротестостерона (приблизительно 50%) и является весьма стойким соединением [243, 244].

Исследования, проводимые зарубежными исследователями, показали, что в мидиях при низких концентрациях эстрадиол может вести себя как эндогенный стероид, регулируя физиологические функции. При этом эстрадиол ингибирует P450-ароматазу (фермент, трансформирующий андрогены в эстрогены) и стимулирует созревание гамет. При высоких концентрациях эстрадиол значительно повышает активность пальмитоил-КоА: эстрадиолацилтрансфераз в качестве механизма для «инактивации» избытка эстрадиола, который поглощается мидиями [143, 144].

Изучив современные научные концепции, можно утверждать, что тестостерон и эстрадиол в гонадах мидий имеет экзогенное происхождение. Тестостерон этерефицируется жирными кислотами, а затем экскретируется в водную среду, в частности с половыми продуктами.

Так как превращение тестостерона в эстрадиол в организме беспозвоночных еще не доказано, скорее всего, эстрадиол также конъюгирует с жирными кислотами, а один из путей его выделения из организма мидий — вместе с половыми продуктами. Очевидно, что экскреция половых продуктов необходима мидиям не только, как механизм размножения, но и для поддержания баланса между свободными и связанными с жирными кислотами формами стероидов.

Отсутствие неопровержимых доказательств существования у моллюсков эндокринной системы, напоминающую по своим функциям систему позвоночных, связано ещё и с тем, что до сих пор отсутствуют сведения о содержании и характере связей общего и «свободного» тестостерона в сперме [34, 119, 138]. Попытки количественного определения концентрации тестостерона и эстрадиола в гонадах по стадиям репродуктивного цикла и в половых продуктах мидий подтверждают участие стероидов в жизненном цикле моллюсков, но не дает однозначного ответа на вопрос о происхождении стероидов в теле мидий. Тестостерон и эстрадиол, имеющие экзогенное происхождение в теле моллюсков, активно участвуют в жизнедеятельности мидий и других беспозвоночных, определяя их пол [101, 195], а также являются потенциальными стимуляторами полового поведения животных [58, 69, 195].

### **3.2 Экскреция тестостерона и эстрадиола вместе с половыми продуктами**

Анализ содержания стероидных гормонов, выраженного в мкг на 1 грамм сухой массы, в гонадах мидии *M. galloprovincialis* на разных стадиях репродуктивного цикла, а также в яйцеклетках и сперматозоидах, представлен в таблице (таблица 3.2).

Таблица 3.2 — Концентрация стероидных гормонов в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах мидии *Mytilus galloprovincialis*

Стадии репродуктивно го цикла, ПП	Концентрация стероидных гормонов, мкг·г <sup>-1</sup> сух.			
	Общий тестостерон		Эстрадиол	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
1	$(7757,8 \pm 2315,2) \cdot 10^{-6}$	$(2154,5 \pm 643,1) \cdot 10^{-6}$	$(90,1 \pm 28,6) \cdot 10^{-6}$	$(512,5 \pm 33,1) \cdot 10^{-6}$
2	$(2453,1 \pm 1409,8) \cdot 10^{-6}$	$(592,1 \pm 112,8) \cdot 10^{-6}$	$(120,9 \pm 27,8) \cdot 10^{-6}$	$(623,0 \pm 40,8) \cdot 10^{-6}$
3	$(781,1 \pm 60,1) \cdot 10^{-6}$	$(210,3 \pm 30,0) \cdot 10^{-6}$	$(104,7 \pm 30,1) \cdot 10^{-6}$	$(747,0 \pm 30,0) \cdot 10^{-6}$
4	$(979,0 \pm 83,9) \cdot 10^{-6}$	$(352,0 \pm 192,0) \cdot 10^{-6}$	$(119,5 \pm 26,3) \cdot 10^{-6}$	$(636,7 \pm 22,0) \cdot 10^{-6}$
5a	$(975,1 \pm 464,3) \cdot 10^{-6}$	$(859,0 \pm 116,1) \cdot 10^{-6}$	$(132,2 \pm 34,3) \cdot 10^{-6}$	$(529,0 \pm 26,1) \cdot 10^{-6}$
5b	$(692,2 \pm 115,4) \cdot 10^{-6}$	$(144,2 \pm 14,4) \cdot 10^{-6}$	$(110,6 \pm 20,4) \cdot 10^{-6}$	$(501,8 \pm 34,4) \cdot 10^{-6}$
Яйцеклетки	н. п.	$(10,1 \pm 4,8) \cdot 10^{-6}$	н. п.	$(539,5 \pm 122,8) \cdot 10^{-6}$
Сперматозоиды	$(14284,8 \pm 259,2) \cdot 10^{-6}$	н. п.	$(194,4 \pm 59,2) \cdot 10^{-6}$	н. п.

Примечание: н. п. — не применимо; 5a и 5b — гонады до и после нереста; ПП — половые продукты.

Как показано в таблице 3.2, концентрации тестостерона и эстрадиола в гонадах и половых продуктах мидии *M. galloprovincialis* зависят от половой принадлежности и стадии репродуктивного цикла [195]. Уменьшение концентрации тестостерона и эстрадиола к концу репродуктивного цикла свидетельствует о роли стероидов в регуляции гаметогенеза. Количество тестостерона в гонадах самцов и самок мидии *M. galloprovincialis* резко снижается от 1 к 3 стадии и в дальнейшем остается примерно на одном уровне (рисунок 3.2). В гонадах после нереста концентрация стероидов ниже, чем до нереста, что говорит об экскреции стероидов вместе с половыми продуктами.

Концентрация эстрадиола в гонадах мидии *M. galloprovincialis* в зависимости от стадии репродуктивного цикла имеет другую динамику (рисунок 3.3). Содержание эстрадиола у самцов остается примерно на одном уровне.

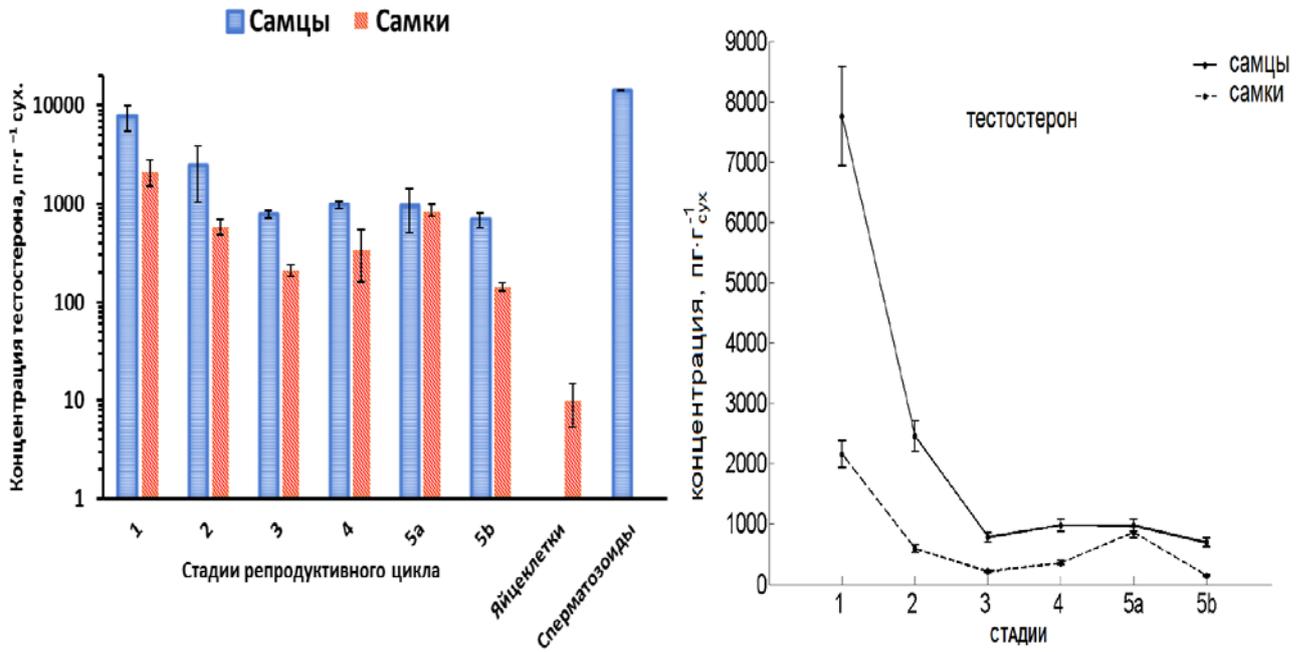


Рисунок 3.2 — Концентрация тестостерона в гонадах мидии *Mytilus galloprovincialis* в зависимости от стадии репродуктивного цикла. 5a и 5b — гонады до и после нереста

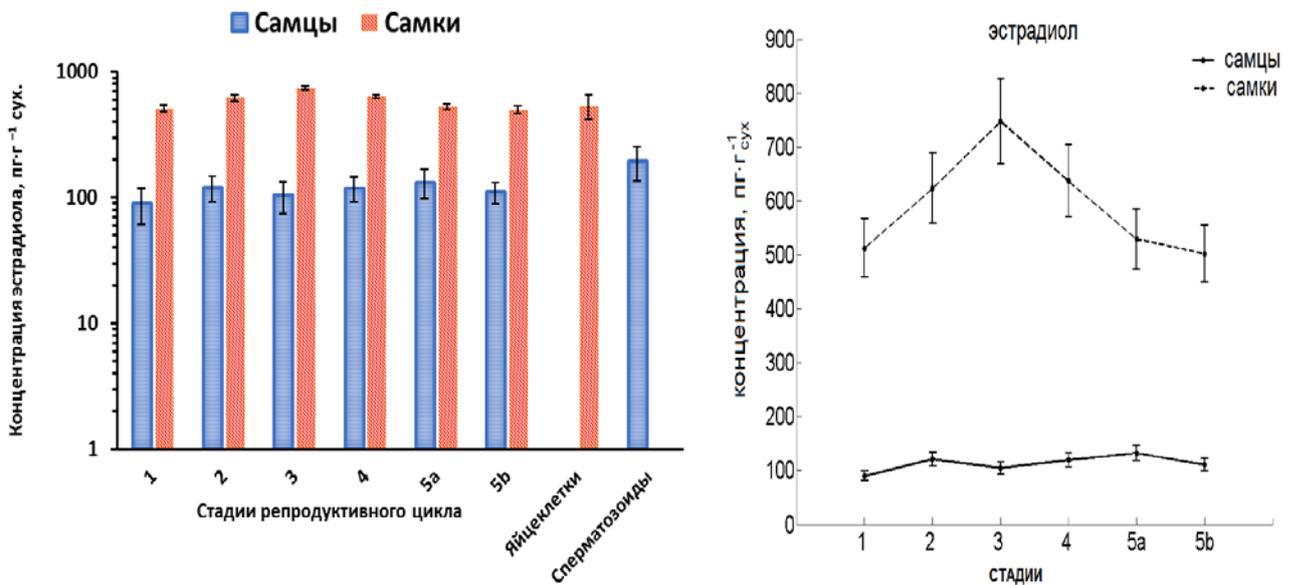


Рисунок 3.3 — Концентрация эстрадиола в гонадах мидии *Mytilus galloprovincialis* в зависимости от стадии репродуктивного цикла. 5a и 5b — гонады до и после нереста

Максимум концентрации эстрадиола отмечен у самок для 3 стадии репродуктивного цикла. Концентрация эстрадиола на 4 стадии репродуктивного цикла гонад самок распределена нормально по критериям Лилиефорса и Андерсона-Дарлинга (рисунок 3.4).

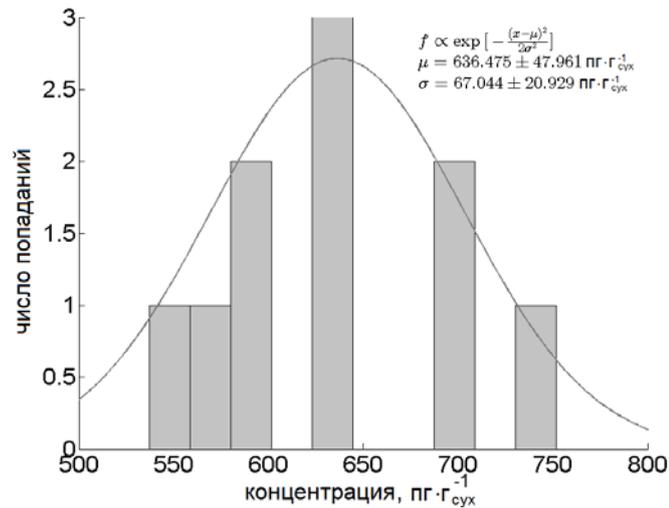


Рисунок 3.4 — Аппроксимация распределения функции Гаусса концентрации эстрадиола в гонадах на 4 стадии репродуктивного цикла мидии *Mytilus galloprovincialis*

Количество стероидов, выделяемых в водную среду во время массового нереста, можно оценить, зная какое количество особей выращивают на определенном участке фермы. Для примерного расчета условимся, что все моллюски являются самцами. Согласно таблице 3.2 в 1 грамме сперматозоидов в пересчете на сухую массу содержится  $14284,8 \pm 259,2$  пг·г<sup>-1</sup> тестостерона.

Если масса половых продуктов, выметанных одним самцом, составляет в среднем 70 мг сухой массы, тогда количество тестостерона в ПП одного самца составит:  $14284,8$  пг·г<sup>-1</sup> сух. ·  $70 \times 10^{-3}$  г сух. · особь<sup>-1</sup> =  $1000$  пг·особь<sup>-1</sup>. Допустим, что в 1 тонне мидий содержится 71124 особей [65], тогда количество тестостерона, выделяемое 1 тонной самцов вместе с половыми продуктами:  $1000$  пг·особь<sup>-1</sup> ·  $71124$  особей·т<sup>-1</sup> =  $71124000$  пг·т<sup>-1</sup> или  $0,1$  мг·т<sup>-1</sup> (таблица 3.3).

Аналогичным способом можно пересчитать концентрацию эстрадиола в сперматозоидах.

В предположении, что в 1 тонне мидий присутствуют исключительно самки, при сухой массе яйцеклеток, выметанных одной особью, равной  $360,2 \pm 121,4 \text{ мг} \cdot \text{особь}^{-1}$  [17], количество эстрадиола в яйцеклетках, выметанных одной самкой, составит:  $539,5 \text{ пг} \cdot \text{г}^{-1} \text{ сух.} \cdot 360,2 \cdot 10^{-3} \text{ г сух.} \cdot \text{особь}^{-1} = 194,3 \text{ пг} \cdot \text{особь}^{-1}$ . В 1 тонне мидий количество эстрадиола:  $193,4 \text{ пг} \cdot \text{особь}^{-1} \cdot 71124 \text{ особей} \cdot \text{г}^{-1} = 13821377,6 \text{ пг} \cdot \text{г}^{-1}$  или  $0,014 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$  (таблица 3.3).

Таблица 3.3 — Экскреция тестостерона и эстрадиола одной тонной мидии *Mytilus galloprovincialis*

Половые продукты	Содержание стероидных гормонов, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$			
	Общий тестостерон		Эстрадиол	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
Яйцеклетки	н. п.	0,0005	н. п.	0,014
Сперматозоиды	0,1	н. п.	0,005	н. п.

Примечание: н. п. — не применимо.

Соотношение полов в выборке моллюсков может меняться. Для мидий размерного ряда 50–60 мм возможно соотношение полов «самки : самцы» 1 : 1, но чаще — 1 : 2 или 1 : 3 [37]. Максимальное число самцов нерестится в июле, соотношение самок и самцов в выборке составляет 25 : 75. Скорее всего, это связано с тем, что яйцеклетки в процессе нереста оседают на дно, так как они менее подвижны и обладают большей массой, чем сперматозоиды. Учитывая условия окружающей среды, для оплодотворения одной яйцеклетки было бы недостаточно лишь одного сперматозоида.

Следует отметить, что оценка генеративной продукции по массе выметанных половых продуктов представляет значительную методическую трудность из-за растянутого периода размножения и порционности выметов. Немногочисленные данные о плодовитости мидий учитывают лишь вымет части

генеративных продуктов, а не суммарный за весь нерестовый период [60]. Понятие гонады в данном контексте условно и означает лишь ту их часть, которая выстилает створки раковины. Полностью извлечь гонады возможно только вместе с тканями висцерального комплекса из-за взаимопроникновения гонад в мантию, гепатопанкреас, соединительные выстилки оснований мускулов и другие органы. Также следует учитывать насыщенность водой гонад. Наиболее обводнены гонады после нереста. Содержание сухого вещества максимально в летний период, а в осенний и зимний периоды заметно уменьшается. Гонадный индекс, определяемый как отношение сухой массы гонад к сухой массе мягких тканей, для популяции мидий, состоящей из моллюсков 2,0–9,2 см длиной, изменяется по сезонам от 8% до 21,3%. Гонадный индекс имеет минимальные значения в период покоя (ноябрь, январь, май), максимальные — перед нерестом (август, декабрь, март) [60].

Согласно данным, приведенным в таблице 3.4, и литературным сведениям [16], стероиды из гонад экскретируются моллюсками в водную среду вместе с половыми продуктами во время нереста [65].

Таблица 3.4 — Содержание тестостерона и эстрадиола в одной тонне мидии *M. galloprovincialis*

Стадии репродуктивного цикла, половые продукты	Содержание стероидных гормонов, $\text{г} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух.}}$			
	Общий тестостерон		Эстрадиол	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
5a	$(975,1 \pm 464,3) \cdot 10^{-6}$	$(859,0 \pm 116,1) \cdot 10^{-6}$	$(132,2 \pm 34,3) \cdot 10^{-6}$	$(529,0 \pm 26,1) \cdot 10^{-6}$
5b	$(692,2 \pm 115,4) \cdot 10^{-6}$	$(144,2 \pm 14,4) \cdot 10^{-6}$	$(110,6 \pm 20,4) \cdot 10^{-6}$	$(501,8 \pm 34,4) \cdot 10^{-6}$
Яйцеклетки	н. п.	$(10,1 \pm 4,8) \cdot 10^{-6}$	н. п.	$(539,5 \pm 122,8) \cdot 10^{-6}$
Сперматозоиды	$(14284,8 \pm 259,2) \cdot 10^{-6}$	н. п.	$(194,4 \pm 59,2) \cdot 10^{-6}$	н. п.

Примечание: н. п. — не применимо; 5a и 5b — гонады до и после нереста.

Установлено, что липиды мидий накапливают стероидные гормоны.

Динамика концентраций тестостерона в гонадах на разных стадиях репродуктивного цикла связана с динамикой содержания жирных кислот [105, 155, 195]. Диаграмма относительного содержания ЖК в гонадах и половых продуктах на разных стадиях репродуктивного цикла представлена на рисунке 3.5.

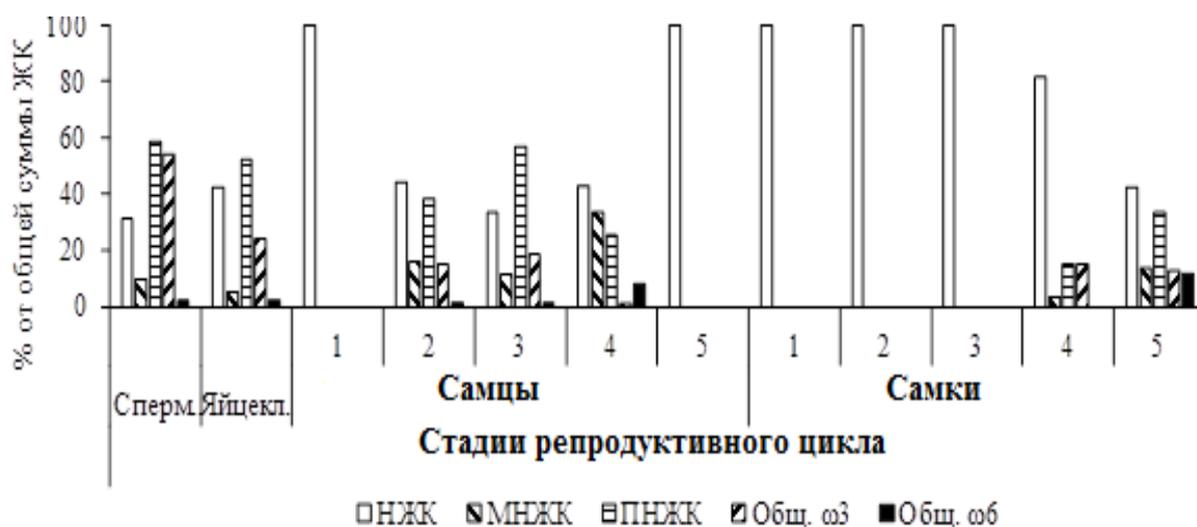


Рисунок 3.5 — Жирнокислотный состав сперматозоидов, яйцеклеток и гонад разных стадий репродуктивного цикла мидии *Mytilus galloprovincialis* (% от суммы всех идентифицированных жирных кислот). НЖК — сумма насыщенных жирных кислот; МНЖК — сумма мононенасыщенных жирных кислот; ПНЖК — сумма полиненасыщенных жирных кислот; общ. ω3 — сумма омега-3 жирных кислот; общ. ω6 — сумма омега-6 жирных кислот

Аналогично стероидным гормонам, содержание ЖК максимально на 1 стадии репродуктивного цикла, в яйцеклетках и сперматозоидах. К концу репродуктивного цикла концентрация НЖК снижается. На 2–4 стадиях репродуктивного цикла в гонадах самцов концентрация НЖК ниже, чем в гонадах самок. Это связано с различной концентрацией тестостерона в гонадах самок и самцов, так как тестостерон по своей природе является преимущественно гормоном самцов и способствует снижению жировых запасов [155]. Видимо,

поэтому в гонадах самок на 1–3 стадиях репродуктивного цикла с высокой степенью вероятности удалось идентифицировать НЖК.

Относительное содержание МНЖК, ПНЖК и половых гормонов достигает максимальных значений по сравнению с гонадами (рисунок 3.5). В сперматозоидах в пересчете на 1 г сухой массы содержание тестостерона превышает его содержание в гонадах более чем в пять раз и на три порядка, чем в яйцеклетках. Максимальное содержание тестостерона в пересчете на 1 г сухой массы отмечена в половых продуктах самцов (таблица 3.1). Среднее содержание эстрадиола в яйцеклетках в 3 раза выше, чем в сперматозоидах. Максимальная концентрация половых стероидов в половых продуктах и снижение концентрации стероидных гормонов в гонадах мидий после нереста объясняется началом фазы посленерестовой перестройки, когда размеры гонад сильно уменьшаются, а зрелые гаметы встречаются редко [35, 65, 68].

**Заключение по 3 главе.** Как показали результаты иммуноферментного анализа, концентрации тестостерона и эстрадиола в гонадах и половых продуктах мидии *M. galloprovincialis* зависят от половой принадлежности, стадии репродуктивного цикла и соответствуют сезонному циклу размножения животных. В гонадах мидий к концу репродуктивного цикла отмечено уменьшение концентрации тестостерона и эстрадиола, играющих ключевую роль в размножении, и увеличение концентрации этих веществ на начальных стадиях репродуктивного цикла и перед нерестом. В сперматозоидах содержание общего тестостерона выше, чем в гонадах. Такое явление согласуется с характером конъюгации жирных кислот со стероидными гормонами, когда перед нерестом повышается доля «свободного» тестостерона или эстрадиола, а в середине цикла, находясь в «связанном» состоянии с жирными кислотами, концентрации стероидов практически не меняются. Этот факт свидетельствует о роли стероидных гормонов в регуляции гаметогенеза вне зависимости от их происхождения в организме моллюсков.

Тестостерон и эстрадиол из гонад экскретируются вместе с половыми продуктами в водную среду, что связано с поддержанием равновесия между свободными и связанными с жирными кислотами формами стероидов. Вместе с половыми продуктами стероиды передаются образующимся личинкам, первые трое суток находящимся на пассивном питании. Одна тонна мидий во время нереста способна выделять в окружающую среду вместе со спермой до 0,1 мг тестостерона, 0,005 мг эстрадиола. С яйцеклетками — 0,0005 мг общего тестостерона и 0,014 мг эстрадиола. Тестостерон и эстрадиол, потребляемые моллюсками вместе с пищей и водой, прежде всего, необходимы моллюскам для роста и развития, а также для осуществления нереста. Часть потребляемых мидиями физиологически активных веществ вовлекается в процесс метаболизма. Избыточные формы стероидных гормонов экскретируются в водную среду вместе с половыми продуктами.

## ГЛАВА 4 СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ГОНАД, ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛИЧИНОК МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

### 4.1 Состав жирных кислот половых продуктов и гонад мидий

На хроматограммах (рисунок 4.1 и 4.2) представлен состав МЭЖК сперматозоидов и яйцеклеток мидии. Сумма всех идентифицированных НЖК в сперматозоидах составила 31,4%, а в яйцеклетках — 42,4% (таблица 4.1). Содержание в яйцеклетках таких основных ЖК, как миристиновой (C14:0) и стеариновой (C18:0), в два раза выше, чем в сперматозоидах. Известно, что насыщенные жирные кислоты участвуют в образовании клеточных мембран как яйцеклеток, так и сперматозоидов [62, 66]. Наблюдаемое значительное преобладание НЖК в яйцеклетках, вероятно, связано с запасом жиров, необходимых для развития зародыша.

Необходимо отметить наличие в половых продуктах не характерной для мидий насыщенной 4,8,12-триметилтридекановой кислоты. В сперматозоидах её относительное содержание составило 0,5%, а в яйцеклетках — 0,1%, что свидетельствует о возможном присутствии в среде, в которой проходил нерест, бактерий, для которых характерно наличие этой ЖК [129].

МНЖК в сперматозоидах мидий представлены пальмитолеиновой (C16:1 $\omega$ 9; 3,7%) и гондоевой (11-эйкозеновой) (C20:1 $\omega$ 9; 6,1%) кислотами. В яйцеклетках содержание этих кислот ниже, чем в сперматозоидах: 1,0% и 4,2%, соответственно. Основные ПНЖК в сперматозоидах и яйцеклетках — эйкозапентаеновая (C20:5 $\omega$ 3) и цервоновая (докозагексаеновая) (C22:6 $\omega$ 3). Суммарное содержание всех ПНЖК в сперматозоидах достигало 58,8%, а в половых продуктах самок — 52,4%. В общей сумме ПНЖК около половины приходилось на эйкозапентаеновую кислоту (C20:5 $\omega$ 3) — одну из нескольких омега-3 ПНЖК, которая защищает структуру клеток от злокачественного перерождения [10]. Содержание эйкозапентаеновой кислоты (C20:5 $\omega$ 3) в яйцеклетках и сперматозоидах мидии *M. galloprovincialis* составило 20% и 26%,

соответственно. Вероятен факт превращения эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3) кислоты в простагландины под действием ферментов [46], являющихся медиаторами с выраженным физиологическим эффектом.

Сперматозоиды и яйцеклетки мидии *M. galloprovincialis* являются источником незаменимой арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты. Её концентрация в половых продуктах самцов и самок примерно одинакова — 2%. В гонадах арахидоновая (C20:4 $\omega$ 6) кислота не обнаружена. Основная функция арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты — синтез простагландинов. Человеческий организм может синтезировать её из незаменимой омега-6-ненасыщенной линолевой кислоты (C18:2 $\omega$ 6) [6].

Линолевая кислота (C18:2 $\omega$ 6) в гонадах мидий обнаружена практически на всех стадиях репродуктивного цикла, хотя в половых продуктах она не найдена. В сперматозоидах и яйцеклетках мидии *M. galloprovincialis* обнаружена 11,14-октадекадиеновая (C18:2 $\omega$ 4) кислота — 2,5% и 1,7%. До настоящего времени разработка химического синтеза арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты является чрезвычайно важной проблемой, поскольку её выделение, например, из коры надпочечников человека, представляет значительные трудности, а в растительных маслах арахидоновая (C20:4 $\omega$ 6) кислота практически отсутствует [26].

ЖК-состав гонад мидии *M. galloprovincialis* изменяется в процессе репродуктивного цикла (таблица 4.1). В гонадах самок на ранних стадиях репродуктивного цикла (с первой по третью) и в гонадах самцов (на первой и на пятой стадиях) существенно преобладают НЖК: миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0).

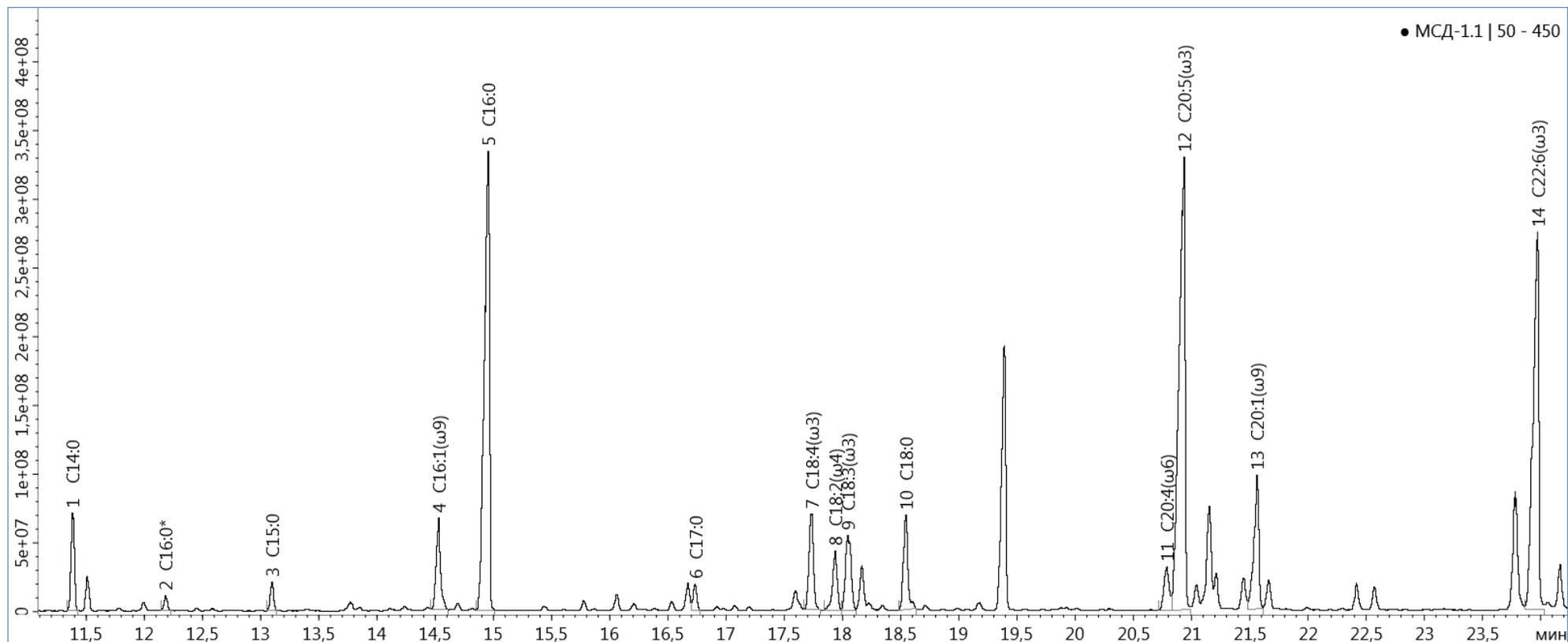


Рисунок 4.1 — Хроматограмма МЭЖК, выделенных из сперматозоидов мидии *Mytilus galloprovincialis*. Отмечены кислоты: 1 — миристиновая (C14:0), 2 — 4,8,12-триметилтридекановая, 3 — пентадекановая (C15:0), 4 — пальмитолеиновая (C16:1ω9), 5 — пальмитиновая (C16:0), 6 — маргариновая (C17:0), 7 — стеаридоновая (C18:4ω3), 8 — 11,14-октадекадиеновая (C18:2ω4), 9 — α-линоленовая (C18:3ω3), 10 — стеариновая (C18:0), 11 — арахидоновая (C20:4ω6), 12 — тимнодоновая или эйкозапентаеновая (C20:5ω3), 13 — гондоевая (C20:1ω9), 14 — цервоновая или докозагексаеновая (C22:6ω3)

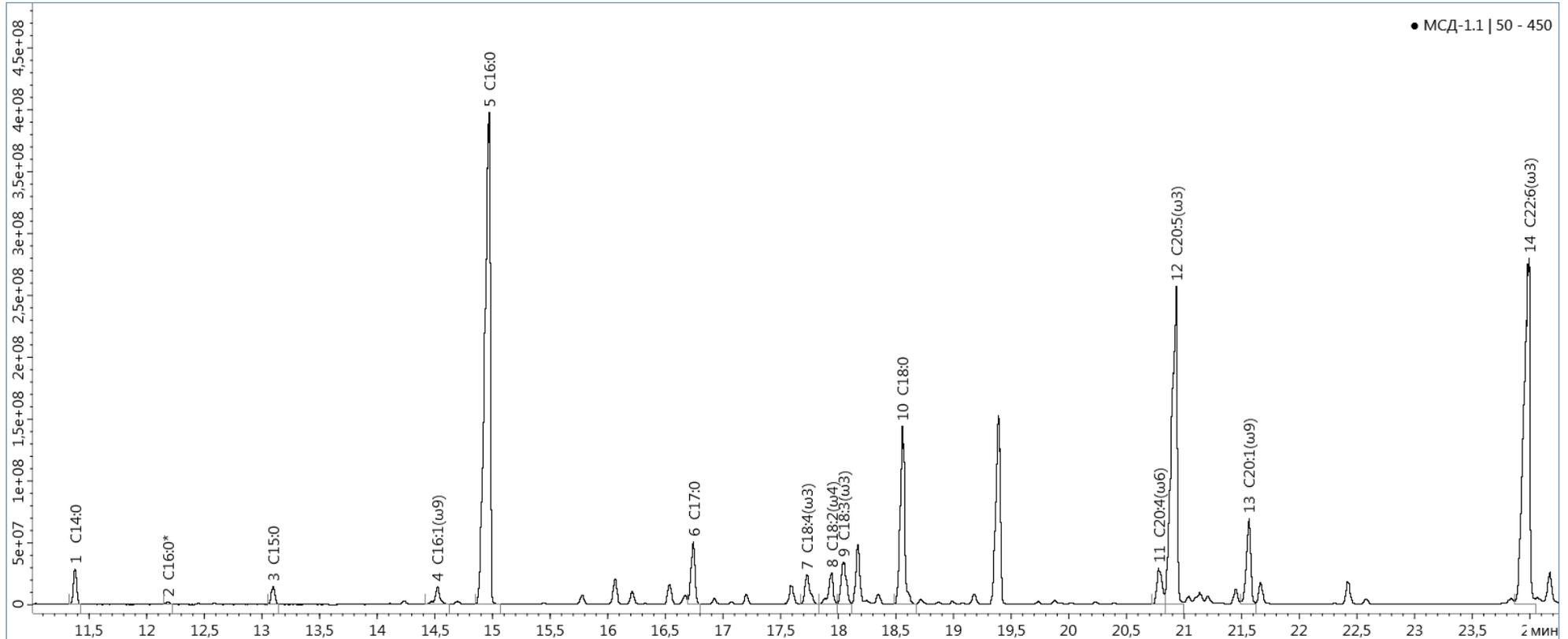


Рисунок 4.2 — Хроматограмма МЭЖК, выделенных из яйцеклеток мидии *Mytilus galloprovincialis*. Отмечены кислоты: 1 — миристиновая (C14:0), 2 — 4,8,12-триметилтридекановая, 3 — пентадекановая (C15:0), 4 — пальмитолеиновая (C16:1ω9), 5 — пальмитиновая (C16:0), 6 — маргариновая (C17:0), 7 — стеаридоновая (C18:4ω3), 8 — 11,14-октадекадиеновая (C18:2ω4), 9 — α-линоленовая (C18:3ω3), 10 — стеариновая (C18:0), 11 — арахидоновая (C20:4ω6), 12 — тимнодоновая или эйкозапентаеновая (C20:5ω3), 13 — гондоевая (C20:1ω9), 14 — цервоновая или докозагексаеновая (C22:6ω3)

Таблица 4.1 — ЖК-состав сперматозоидов, яйцеклеток и гонад разных стадий репродуктивного цикла мидии *Mytilus galloprovincialis*

ЖК, % от суммы всех идентифицированных кислот	Сперматозоиды	Яйцеклетки	2 ♂♂	3 ♂♂	4 ♂♂	4 ♀♀	5 ♀♀
Миристиновая (C14:0) или тетрадекановая	3,1 ± 0,3 <sup>*†</sup>	1,3 ± 0,0 <sup>*†</sup>	5,4 ± 0,3	3,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2	11,1 ± 1,1	18,8 ± 0,5
Пентадециловая (C15:0) или пентадекановая	0,9 ± 0,0 <sup>*†</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>*†</sup>	1,40 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,4 ± 0,1	2,1 ± 0,0	н. о.
Пальмитиновая (C16:0) или гексадекановая	22,4 ± 0,6 <sup>*†</sup>	30,3 ± 0,8 <sup>*†</sup>	31,2 ± 1,3	23,6 ± 1,1	28,4 ± 0,6	50,3 ± 2,6	12,4 ± 0,4
Пальмитолеиновая (C16:1ω9) или 9-гексадеценовая	3,7 ± 0,8	1,0 ± 0,0	11,8 ± 0,5	7,0 ± 0,4	5,1 ± 0,2	н. о.	11,9 ± 0,7
Маргариновая (C17:0) или гептадекановая	0,5 ± 0,2 <sup>*†</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>*†</sup>	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	н. о.	0,8 ± 0,0	н. о.
Стеариновая (C18:0) или октадекановая	4,0 ± 0,8 <sup>†</sup>	8,9 ± 0,2 <sup>†</sup>	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,0	5,3 ± 0,2	16,7 ± 0,6	11,2 ± 0,7
Элаидиновая (C18:1ω9) или 9-октадеценовая	н. о.	н. о.	3,8 ± 0,3	4,2 ± 0,2	28,4 ± 0,8	н. о.	12,0 ± 0,7
Линолевая (C18:2ω6) или 9,12-октадекадиеновая	н. о.	н. о.	3,7 ± 0,2	3,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	н. о.	11,8 ± 0,7
α-Линоленовая (C18:3ω3) или 9,12,15-октадекатриеновая	4,0 ± 0,2	2,5 ± 0,1	н. о.				
Пиноленовая (C18:3ω6) или 5,9,12-октадекатриеновая	н. о.	н. о.	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,2	5,0 ± 0,2	н. о.	н. о.
Стеаридоновая (C18:4ω3) или 6,9,12,15-октадекатетраеновая	4,0 ± 0,9	1,7 ± 0,0	н. о.				
Гондоевая (C20:1ω9) или 11-эйкозеновая	6,1 ± 0,0	4,2 ± 0,6	н. о.	н. о.	2,4 ± 0,2	1,2 ± 0,0	н. о.
Арахидоновая (C20:4ω6) или 5,8,11,14-эйкозатетраеновая	2,2 ± 0,1 <sup>†</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>†</sup>	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	н. о.	н. о.
Тимнодоновая (C20:5ω3) или 5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая	26,0 ± 0,7 <sup>*†</sup>	20,0 ± 0,7 <sup>*†</sup>	13,3 ± 0,1	16,7 ± 0,1	6,2 ± 0,2	15,2 ± 0,7	12,9 ± 0,5

Продолжение таблицы 4.1

ЖК, % от суммы всех идентифицированных кислот	Сперматозоиды	Яйцеклетки	2 ♂♂	3 ♂♂	4 ♂♂	4 ♀♀	5 ♀♀
Эруковая (C22:1ω9) или 13-докозеновая	н. о.	н. о.	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	н. о.	2,3 ± 0,1	н. о.
Цервоновая (C22:6ω3) или 4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая	20,0 ± 0,0	24,4 ± 0,1	15,3 ± 0,3	29,9 ± 0,4	7,4 ± 0,4	н. о.	8,8 ± 0,0
Сумма всех НЖК	31,4	42,4	44,3	33,6	42,8	81,32	42,6
Сумма всех МНЖК	9,8	5,1	15,8	11,3	33,5	3,5	13,9
Сумма всех ПНЖК	58,8	52,4	38,6	56,7	25,3	15,2	33,5
Все омега-3 ЖК (Общ. ω3)	54,2	24,2	14,9	18,6	1,4	15,2	12,9
Все омега-6 ЖК (Общ. ω6)	2,2	2,1	1,2	1,4	8,0	н. о.	11,6

Примечание: данные представлены в процентах от суммы всех ЖК как среднее арифметическое ± ошибка среднего; 2 ♂♂, 3 ♂♂, 4 ♂♂, 5 ♂♂ — вторая, третья, четвертая и пятая стадии репродуктивного цикла самцов; 4 ♀♀, 5 ♀♀ — четвертая и пятая стадии репродуктивного цикла самок; \* — достоверные отличия согласно *t*-критерию Стьюдента; † — сомнительные отличия согласно критерию Колмогорова-Смирнова; н. о. — не обнаружено.

Некоторые идентифицированные ЖК не отмечены в таблице 4.1, так как их относительное содержание было сравнительно невысоким. Например, лауриновая кислота (C12:0), которую удалось идентифицировать в гонадах самок на 2, 3 и 4 стадиях репродуктивного цикла в количествах:  $0,3 \pm 0,0\%$ ;  $1,1 \pm 0,1\%$  и  $0,1 \pm 0,0\%$ , соответственно. А также на 5 стадии в гонадах самцов —  $2,5 \pm 0,1\%$ . Тридециловая (C13:0) кислота обнаружена в гонадах самок на 2, 3 и 4 стадиях ( $0,8 \pm 0,0\%$ ;  $1,5 \pm 0,0\%$ ;  $0,10 \pm 0,04\%$ ) и на 5 стадии в гонадах самцов —  $4 \pm 0,1\%$ . Трикозиловая (C23:0) кислота в равных концентрациях —  $0,3 \pm 0,0\%$  на 2 и 3 стадиях репродуктивного цикла исключительно в гонадах самцов.

Концентрация лигноцериновой (C24:0) кислоты на 2 стадии репродуктивного цикла в гонадах самок не превышала  $0,4 \pm 0,0\%$ , а в гонадах самцов на 2 и 4 стадиях составила  $0,2 \pm 0,0\%$  и  $3,3 \pm 0,1\%$ , соответственно. Концентрации лауриновой (C12:0), тридециловой (C13:0), трикозиловой (C23:0) и лигноцериновой (C24:0) кислот не отображены в таблице 4.1, но их вклад учтен в общую сумму всех идентифицированных насыщенных жирных кислот.

Концентрация НЖК в гонадах самок мидии *M. galloprovincialis* с первой по пятой стадии репродуктивного цикла на 20% выше, чем в гонадах самцов. НЖК, встречающиеся в липидах мидии, содержит 16 или 18 атомов углерода; эти кислоты либо насыщены, либо имеют одну или более двойных связей. Видимо, эти кислоты поступают в половые продукты из гонад и играют ключевую роль в этерификации стероидов. Пальмитиновая (C16:0) кислота является одной из первых жирных кислот, продуцируемых в процессе липогенеза, и основная ЖК у моллюсков [115, 116, 117]. Высокое содержание пальмитиновой (C16:0) кислоты характерно для всех видов морских двустворчатых моллюсков. Так, её содержание в моллюсках *Ruditapes philippinarum* составило от 19,6% до 26,9% [93]. Пальмитиновая (C16:0) кислота — основная ЖК как минимум у 51 морских беспозвоночных, обитающих в Японском море [109].

В наших исследованиях в гонадах мидии *M. galloprovincialis* МНЖК и ПНЖК отсутствовали на первой стадии репродуктивного цикла в гонадах самцов и с первой по третью стадии репродуктивного цикла у самок. Начиная со второй стадии, в гонадах самцов количество МНЖК и ПНЖК было значительно выше, чем у самок, в которых МНЖК и ПНЖК обнаружены только на четвертой и пятой стадиях. Вероятно, это связано с более высокой концентрацией тестостерона в гонадах самцов. Такие кислоты, как эйкозодиеновая (C20:2 $\omega$ 6) и эйкозатриеновая (C20:3 $\omega$ 3), содержание которых не превышало 2%, найдены в гонадах самок и самцов лишь на 2–4 стадиях репродуктивного цикла. Это связано с тем, что для морских моллюсков вообще не характерно наличие арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты [189]. У моллюсков концентрация арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты увеличивается под влиянием абиотических факторов (соленость, кратковременная аноксия, загрязненность поллютантами органического происхождения и т. д.) [62, 258].

На ЖК-состав моллюсков влияет рацион питания. Планктонные и донные микроводоросли, зоопланктон, простейшие, в том числе гетеротрофные жгутики и инфузории, а также бактерии детрита являются основными компонентами рациона двустворчатых моллюсков [150, 247].

Поскольку у двустворчатых моллюсков ограничен или вообще отсутствует синтез C20 – C22 ПНЖК с более чем тремя двойными связями, они приобретают большинство ПНЖК, например, эйкозапентаеновую (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновую (C22:6 $\omega$ 3), из обогащенной этими кислотами пищи [202]. Ферменты, необходимые для производства эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) кислот из элаидиновой (C18:1 $\omega$ 9) кислоты, описаны у некоторых видов водорослей [137].

Элаидиновая (C18:1 $\omega$ 9) ЖК образуются под действием ацилдесатуразы. Элаидиновая (C18:1 $\omega$ 9) кислота может быть далее ненасыщена под действием десатураз [151, 191]. В большинстве видов морских моллюсков, по-видимому, не

осуществляется синтез этих ЖК. Наличие докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) кислоты у мидий отражает способность к адаптациям с характерными структурными и функциональными механизмами «перестройки», протекающими в биологических мембранах, в ответ на изменение условий окружающей среды (температура, соленость и другие факторы) [104, 192, 199].

Присутствие эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3) кислоты в высоких концентрациях (более 20%) является показателем потребления моллюсками диатомовых микроводорослей. Изучение влияния питания половозрелых мидий *M. edulis* монокультурами *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros muelleri* и *Nannochloropsis* sp. с различным липидным составом на композицию жирных кислот в гепатопанкреасе показало, что после 10 суток кормления наблюдали увеличение доли эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) кислот. При этом содержание насыщенных жирных кислот снижалось [63].

Исследование модификаций спектра жирных кислот мидии *M. edulis* из Белого моря в результате акклиматизации к лабораторным условиям с использованием в качестве источника пищи искусственного корма показало, что ЖК-состав гепатопанкреаса зависит исключительно от состава пищи. ЖК-состав мембранных липидов и жабр практически не зависит от источника пищи [62].

Тимнодоновая (эйкозапентаеновая) (C20:5 $\omega$ 3) кислота — одна из нескольких омега-3 ПНЖК, которая защищает структуру клеток от злокачественного перерождения и, по нашим данным, её содержание в яйцеклетках и сперматозоидах мидии *M. galloprovincialis* приблизительно одинаково. Вероятен факт превращения тимнодоновой (C20:5 $\omega$ 3) кислоты в простагландины под действием ферментов, являющихся медиаторами с выраженным физиологическим эффектом [25].

ЖК в организме мидий, как и в других беспозвоночных, выполняют одну из самых важных функций — конъюгацию или этерификацию, т. е. превращение стероидов в неполярную форму, которая сохраняется в организме, снижая

биологическую активность, биодоступность и разрушение гормонов. Основная функция этерификации — инактивации стероидов. Этерификация происходит у позвоночных и беспозвоночных животных. Независимо от количества тестостерона, количество «свободного» тестостерона в тканях организма остается относительно постоянным, а избыток стероида превращается в эфиры жирных кислот. Механизм этерификации стероидов у беспозвоночных ещё не изучен [115, 116, 117].

Изменение ЖК-профиля гонад и половых продуктов мидии *M. galloprovincialis* показывает, что ЖК принимают непосредственное участие в конъюгации стероидов. ЖК вовлечены в процесс размножения мидий.

Увеличение доли ПНЖК в сперме мидий способствует выживанию сперматозоидов до момента достижения неподвижных, пассивно перемещающихся яйцеклеток. Так как в организме моллюсков МНЖК и ПНЖК преимущественно синтезируются из насыщенных кислот, а реакция этерификации со стероидами происходит у НЖК, в яйцеклетках доминируют НЖК, обеспечивая защитную функцию. Резервов, полученных вместе с ЖК и стероидным потенциалом яйцеклеток и сперматозоидов, достаточно образовавшимся личинкам, чтобы развиваться, находясь на пассивном питании.

Как показано в таблице 4.2, содержание НЖК в трохофорах мидий практически равно суммарному содержанию НЖК в яйцеклетках и сперматозоидах. Такую закономерность можно объяснить тем, что до закладки органов и тканей трохофоры мидий находятся на пассивном питании и, по-видимому, НЖК выполняют преимущественно защитную функцию, формируя оболочки клеточных мембран [62]. Кроме этого, на начальных стадиях репродуктивного цикла ЖК, вероятно, участвуют в этерификации стероидных гормонов, так как в этот процесс вовлечены преимущественно С16 и С18 НЖК [225, 226, 227].

Таблица 4.2 — Содержание жирных кислот в гонадах, половых продуктах и трохофорах мидии *Mytilus galloprovincialis*

Стадии репродуктивного цикла, половые продукты	Содержание ЖК в общих липидах, %								
	НЖК			МНЖК			ПНЖК		
	♂♂	♀♀	Личинки	♂♂	♀♀	Личинки	♂♂	♀♀	Личинки
1	100	100		н. о.	н. о.		н. о.	н. о.	
2	48,2	100		15,8	н. о.		36,0	н. о.	
3	35,1	100		11,3	н. о.		53,6	н. о.	
4	42,5	81,1	58,2	35,9	3,7	31,6	21,6	15,2	10,2
5	100	44,4		н. о.	22,1		н. о.	33,5	
Яйцеклетки	н. п.	46,7		н. п.	5,2		н. п.	48,1	
Сперматозоиды	34,0	н. п.		9,8	н. п.		56,2	н. п.	

Примечание: н. о. — не обнаружено; н. п. — не применимо.

#### 4.2 Содержание хлорорганических соединений в гонадах и половых продуктах мидий

В гонадах и половых продуктах мидий, выращенных на ферме Карантинной бухты, из шести определяемых индикаторных ПХБ во всех пробах обнаружены пять конгенов ПХБ: 28; 101; 138; 153 и 180, а также ДДТ и его метаболиты (таблица 4.3) [35].

Таблица 4.3 — Концентрации конгенов ПХБ,  $\Sigma$ ДДТ ( $\text{нг} \cdot \text{г}^{-1}$  сухой массы), общих липидов (% сухой массы) в гонадах и половых продуктах самцов и самок культивируемой мидии *Mytilus galloprovincialis*

Объект	Общие липиды	ПХБ 28	ПХБ 101	ПХБ 138	ПХБ 153	ПХБ 180	$\Sigma$ ПХБ <sub>5</sub>	$\Sigma$ ДДТ
	$\text{нг} \cdot \text{г}^{-1}$ сухой массы							
Г ♀♀ до нереста	9,03	1,23	10,43	42,17	44,46	1,51	99,80	1,53

Продолжение таблицы 4.3

Объект	Общие липиды	ПХБ 28	ПХБ 101	ПХБ 138	ПХБ 153	ПХБ 180	$\Sigma$ ПХБ <sub>5</sub>	$\Sigma$ ДДТ
	нг·г <sup>-1</sup> сухой массы							
Г ♀♀ после нереста	7,93	0,63	14,24	22,12	28,35	2,12	67,46	1,30
Яйцеклетки	10,71	0,80	13,29	35,13	32,99	3,29	85,50	0,47
Г ♂♂ до нереста	6,44	0,77	6,78	19,14	22,61	4,55	53,85	1,20
Г ♂♂ после нереста	5,74	н. о.	3,15	6,53	6,42	0,47	16,57	н. о.
Сперматозоиды	6,93	0,67	10,61	29,97	27,86	6,64	75,75	2,14

Примечание: н. о. — не обнаружено.

Результаты анализов ХОС в половых продуктах и гонадах мидий после нереста показали, что ХОС вместе с липидами включаются в метаболические процессы и во время гаметогенеза перераспределяются в тканях гонад, яйцеклеток и сперматозоидов [253]. Так, после нереста концентрация липидов в гонадах самок снизилась с 9,03% до 7,93%, а содержание в них  $\Sigma$ ПХБ<sub>5</sub> уменьшилось с 99,80 до 67,46 нг·г<sup>-1</sup>. В яйцеклетках концентрация липидов составила 10,71%, а  $\Sigma$ ПХБ<sub>5</sub> — 85,0 нг·г<sup>-1</sup>. В гонадах самцов прослеживалась аналогичная тенденция изменения концентрации жиров и еще более существенная — в содержании  $\Sigma$ ПХБ<sub>5</sub>. До нереста жирность гонад составила у самцов 6,44%, после нереста — 5,74%, а содержание  $\Sigma$ ПХБ<sub>5</sub> после нереста уменьшилось с 53,85 до 16,57 нг·г<sup>-1</sup>. При этом концентрация  $\Sigma$ ПХБ<sub>5</sub> в сперматозоидах составила 75,75 нг·г<sup>-1</sup>, а жирность — 6,93%.

Перераспределение в гонадах и половых продуктах наблюдали и для ДДТ и его метаболитов. После нереста концентрация  $\Sigma$ ДДТ в гонадах самок несколько уменьшилась, а в гонадах самцов ДДТ и метаболиты определены не были. В сперматозоидах обнаружено 2,14 нг·г<sup>-1</sup>  $\Sigma$ ДДТ. Можно предположить, что во время нереста мидии *M. galloprovincialis* ДДТ и метаболиты выводятся из организма моллюсков вместе с половыми продуктами, что согласуется с истощением также и липидных запасов мидий во время вымета половых продуктов.

Изучение накопления ХОС обитателями Севастопольской бухты показали, что такие крупные виды гидробионтов, как рыбы, обладают высокой аккумулирующей способностью в отношении ХОС. Это проявляется в накоплении ХОС в количествах, значительно превышающих их концентрации в морской воде. Так, отмечена положительная корреляция между жирностью тканей черноморской камбалы калкан и содержанием ХОС в её органах [65]. Для мидий также прослеживается половая дифференциация в накоплении ХОС гонадами в соответствии с жирностью их тканей. Жирность гонад самок мидии превышает в 1,44 раза жирность гонад самцов, и соответственно концентрация ПХБ в гонадах у самок выше почти в два раза, чем у самцов [35]. Зависимость концентраций конгенов ПХБ 101; 138 и 153 от жирности тканей мидии может быть описана линейной функцией (рис. 4.3).

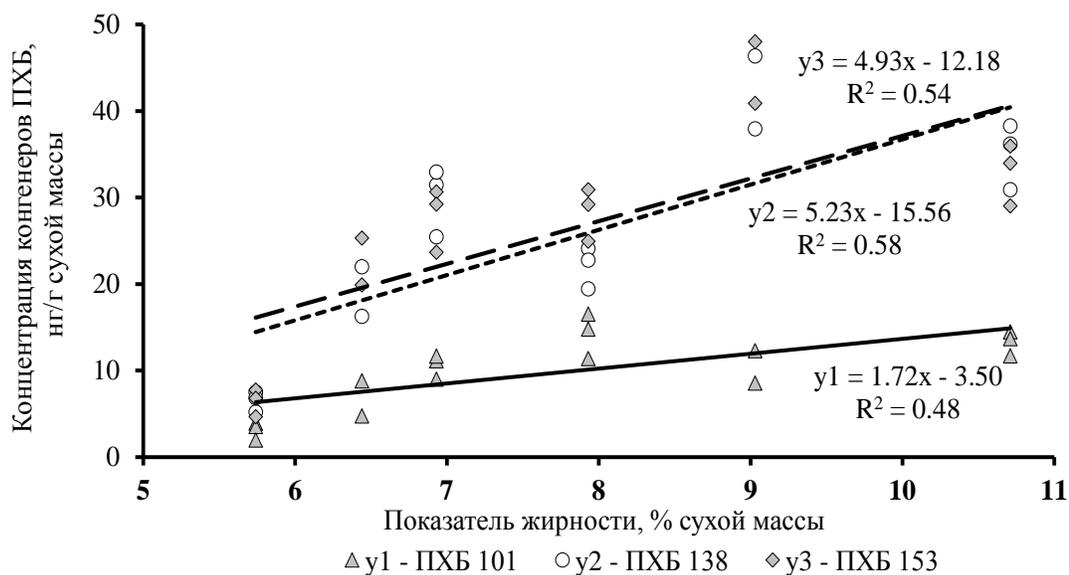


Рисунок 4.3 — Зависимость содержания трех конгенов ПХБ (101; 138; 153) в органах мидии *Mytilus galloprovincialis* от жирности ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 16$ )

Для оценки аккумуляционной способности мидий в отношении ХОС определены коэффициенты накопления  $K_n$  (таблица 4.4).

Таблица 4.4 — Коэффициенты накопления ХОС ( $K_n$ ) в мягких тканях и гонадах самцов и самок мидии *Mytilus galloprovincialis*

Объект	$K_n$ ПХБ 28	$K_n$ ПХБ 101	$K_n$ ПХБ 138	$K_n$ ПХБ 153	$K_n$ ПХБ 180	$K_n$ $\Sigma$ ПХБ <sub>5</sub>	$K_n$ $\Sigma$ ДДТ
Мягкие ткани ♀♀	н. д.	$1,4 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	$0,9 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^3$
Мягкие ткани ♂♂	н. д.	$1,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$0,8 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^3$
Г ♀♀ до нереста	$4,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$	$9,4 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^3$
Г ♂♂ до нереста	$2,7 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^3$

Примечание: н. д. — нет данных.

Концентрация отдельных ХОС в воде в районе мидийно-устричной фермы Карантинной бухты г. Севастополя изменялась в диапазоне от 0,16 до 2,62 нг·л<sup>-1</sup>. Коэффициенты накопления конгенов ПХБ гонадами до нереста имели высокую вариабельность и отличались на порядок, изменяясь от  $2,7 \cdot 10^3$  до  $2,8 \cdot 10^4$  (таблица 4.4). Коэффициент накопления  $\Sigma$ ПХБ<sub>5</sub> в гонадах самок почти в два раза превышал таковой у самцов. Также более высокий коэффициент накопления отмечен у гонад самок для  $\Sigma$ ДДТ. В то же время расчет  $K_n$  как  $\Sigma$ ПХБ<sub>5</sub>, так и  $\Sigma$ ДДТ в мягких тканях самок и самцов показал одинаковые значения.

Известно, что химические загрязнители воздействуют на репродуктивные органы мидий, вызывая эндокринные нарушения. Синтетические поллютанты нарушают эндогенную конъюгацию ЖК с гормонами. Изменения в этом процессе могут повлиять на смещение равновесия между свободной формой биологически активных стероидов и сложными эфирами ЖК [132]. Под действием различного рода поллютантов увеличивается концентрация этерифицированных стероидов. Этерификация тестостерона и эстрадиола с ЖК хорошо описана для брюхоногих моллюсков *Plyanassa obsoleta* и двустворчатых моллюсков *Crassostrea virginica* и *M. galloprovincialis*. Конъюгаты ЖК могут играть ключевую роль, регулируемую физиологические уровни свободных стероидов в тканях [127, 128, 143, 144].

Хлорсодержащие химические вещества, растворимые в липидах мидий, накапливаются в организме и, как следствие, входят в пищевую цепь. Известно, что мидии активно накапливают липиды во время гаметогенеза. Но, как показали многочисленные исследования, вместе с жирами в организмах мидий накапливаются липофильные ХОС [95, 97, 246]. Синтетические органические поллютанты характеризуются устойчивостью к разрушению, низкой растворимостью в воде и высокой растворимостью в липидах, которая возрастает с увеличением количества атомов хлора [106, 203, 236].

Ранее прямой связи между репродуктивной стадией, содержанием липидов и накоплением ПХБ, ДДЦ и ГХЦГ в мидиях не наблюдали, однако отмечали высокую статистически значимую корреляцию между общим содержанием липидов и ХОС [239].

Пестициды влияют на все уровни пищевой цепи от самого низкого, начиная от фитопланктона, и до самого высокого уровня [141]. Мидии являются фильтраторами, поэтому накапливают хлорорганические поллютанты, снижающие иммунологическую реактивность и вызывающие серьезные изменения в тканях пищеварительных органов, жабрах и яичниках [174, 175]. Снижение активности ферментов тканей мидий указывает на реакцию организма на действие таких загрязняющих веществ, как пестициды [61].

Необходимо отметить, что уровень загрязнений способен влиять и на количество стероидов в мидиях [165]. Так, присутствие нефтяных загрязнителей в Северном море вызвало значительное увеличение уровня «свободного» эстрадиола в периферических тканях мидии *Mytilus edulis*. В гонадах изменения концентрации эстрадиола не происходило.

### 4.3 Состав жирных кислот трохофор мидий, выращенных в условиях загрязненности полихлорбифенилами

Уровень накопления ПХБ мидиями зависит от многих факторов: показателя жирности, размера моллюсков, стадии репродуктивного цикла. Индивидуальные отличия этих показателей определяют широкие диапазоны содержания хлорорганических токсикантов в особях, отобранных в одном районе. Так, концентрация ПХБ в мягких тканях культивируемой мидии *M. galloprovincialis* изменялась в диапазоне от 14 до 162 нг·г<sup>-1</sup> и в среднем составляла 68 нг·г<sup>-1</sup>. По критериям, установленным в странах ЕС, качество мидий не превышает установленного порога концентрации ПХБ, равного 250 нг·г<sup>-1</sup> [65]. Сравнение уровня загрязненности мидий для  $\Sigma$ ПХБ с ПДК, равной 2000 нг·г<sup>-1</sup> [59], показывает, что риска употребления мидий с фермы для человека не выявлено. В проведенных экспериментах по влиянию экологически значимых доз ПХБ на личинки (трохофоры) мидий определен их отклик на загрязнение, проявившийся в изменении ЖК-состава. Полученные результаты представлены в таблицах 4.5 и 4.6.

Таблица 4.5 — Содержание жирных кислот (%) в общих липидах трохофор мидии *Mytilus galloprovincialis*, выращенных в среде с различной концентрацией ПХБ

Идентифицированные ЖК	Концентрация ПХБ, мкг·л <sup>-1</sup>				
	Контроль	0,1	1	10	Ацетон
	Содержание ЖК (% от суммы)				
Лауриновая (додекановая) C12:0	1,4 ± 0,6	0,6 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,5
Миристиновая (тетрадекановая) C14:0	6,2 ± 0,2	5,7 ± 0,6	7,7 ± 0,7	6,4 ± 0,4	6,5 ± 0,6
Пентадекановая (пентадециловая) C15:0	4,4 ± 0,8	5,3 ± 1,1	8,5 ± 0,5	5,8 ± 0,2	4,7 ± 0,7
Пальмитолеиновая ( <i>цис</i> -9-гексадеценная) C16:1 $\omega$ 7	11,0 ± 0,6	6,8 ± 0,6	7,0 ± 0,2	9,6 ± 0,4	10,8 ± 0,8
Пальмитиновая (гексадекановая) C16:0	29,3 ± 4,3	33,8 ± 0,4	30,1 ± 0,3	34,7 ± 0,6	31,7 ± 2,3

Продолжение таблицы 4.5

Идентифицированные ЖК	Концентрация ПХБ, мкг·л <sup>-1</sup>				
	Контроль	0,1	1	10	Ацетон
	Содержание ЖК (% от суммы)				
<i>цис</i> -10-Гептадеценовая C17:1 $\omega$ 7	3,9 ± 1,5	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,4	2,4 ± 1,5
14-Метилгексадекановая <i>антеизо</i> -C17:0	2,4 ± 0,5	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,8
Арахидоновая ( <i>цис, цис, цис, цис</i> -5,8,11,14-эйкозатетраеновая) C20:4 $\omega$ 6	1,3 ± 0,2	20,5 ± 1,5	12,8 ± 0,6	3,3 ± 0,3	1,0 ± 0,4
Линолевая ( <i>цис, цис</i> -9,12-октадекадиеновая) C18:2 $\omega$ 6	2,2 ± 0,6	3,0 ± 0,3	4,8 ± 0,6	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,7
Олеиновая ( <i>цис</i> -9-октадеценовая) C18: 1 $\omega$ 9	14,4 ± 1,5	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2	15,3 ± 0,4	14,6 ± 1,1
Вакценовая ( <i>цис</i> -11-октадеценовая) C18: 1 $\omega$ 7	2,4 ± 0,3	5,8 ± 0,3	5,7 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,7
Сумма двух изомеров октадеценовых кислот	16,8 ± 1,8	7,3 ± 0,5	6,9 ± 0,4	17,7 ± 0,7	17,1 ± 1,8
Стеариновая (октадекановая) C18:0	14,4 ± 0,5	8,1 ± 0,4	10,3 ± 0,3	9,2 ± 0,3	13,3 ± 0,5
Эйкозапентаеновая ( <i>цис, цис, цис, цис, цис</i> -5,8,11,14,17-эйкозагексаеновая, ЭПК) C20:5 $\omega$ 3	4,2 ± 0,6	3,0 ± 0,2	4,0 ± 0,1	4,6 ± 0,3	4,3 ± 0,3
Докозагексаеновая ( <i>цис, цис, цис, цис, цис, цис</i> -4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая, ДГК) C22:6 $\omega$ 3	2,4 ± 1,0	2,9 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,5
Сумма насыщенных жирных кислот	58,2	55,3	60,2	59,1	60,3
Сумма мононенасыщенных жирных кислот	31,6	15,3	15,1	28,8	30,3
Сумма полиненасыщенных жирных кислот	10,2	29,4	24,7	12,1	9,5
Сумма ненасыщенных жирных кислот	41,8	44,7	39,8	40,9	39,8
Отношение суммы насыщенных к сумме полиненасыщенных жирных кислот	1,4	1,2	1,5	1,4	1,5

Таблица 4.6 — Значимые отличия (обозначены плюсом) ЖК-состава липидов трохофор мидии *Mytilus galloprovincialis* при разных концентрациях загрязнителя согласно однофакторному дисперсионному анализу (число степеней свободы  $df = 4$ ) и проверке по апостериорному критерию Тьюки-Крамера

ЖК	Концентрации загрязнителя	Контроль	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	1 мкг·л <sup>-1</sup>	10 мкг·л <sup>-1</sup>	<i>F</i>	<i>p</i>
Лауриновая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>-</del>	-	-	0,620	0,66
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	-	-	-		
Миристиновая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>-</del>	-	-	1,81	0,20
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	-	-	-		
Пентадекановая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>-</del>	-	-	5,40	1,4·10 <sup>-2</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	+	-	-		
Пальмитолеиновая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	<del>-</del>	-	-	13,32	5,1·10 <sup>-4</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	+	+	-		
Пальмитиновая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>-</del>	-	-	1,11	0,41
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	-	-	-		

Продолжение таблицы 4.6

ЖК	Концентрации загрязнителя	Контроль	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	1 мкг·л <sup>-1</sup>	10 мкг·л <sup>-1</sup>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Цис</i> -10-гептадеценовая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>—</del>	-	-	1,48	0,28
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>—</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>—</del>		
	ацетон	-	-	-	-		
14-Метилгексадекановая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>—</del>	-	-	0,58	0,68
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>—</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>—</del>		
	ацетон	-	-	-	-		
<b>Арахидоновая</b>	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	<del>—</del>	-	+	124	1,8·10 <sup>-8</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>—</del>	+		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	+	+	<del>—</del>		
	ацетон	-	+	+	-		
<b>Линолевая</b>	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>—</del>	-	-	6,80	6,6·10 <sup>-3</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>—</del>	+		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	+	<del>—</del>		
	ацетон	-	-	+	-		
<b>Олеиновая</b>	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	<del>—</del>	-	+	71,3	2,6·10 <sup>-7</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>—</del>	+		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	+	+	<del>—</del>		
	ацетон	-	+	+	-		
<b>Вакценовая</b>	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	<del>—</del>	-	+	23,1	4,9·10 <sup>-5</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>—</del>	+		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	+	+	<del>—</del>		
	ацетон	-	+	+	-		
<b>Стеариновая</b>	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	<del>—</del>	-	-	41,2	3,5·10 <sup>-6</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>—</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	-	<del>—</del>		
	ацетон	-	+	+	+		

Продолжение таблицы 4.6

ЖК	Концентрации загрязнителя	Контроль	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	1 мкг·л <sup>-1</sup>	10 мкг·л <sup>-1</sup>	<i>F</i>	<i>p</i>
Эйкозапентаеновая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>-</del>	-	-	3,52	5,0·10 <sup>-2</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	-	-	-		
Докозагексаеновая	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>-</del>	-	-	0,344	0,84
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	-	-	-		
Сумма НЖК	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	<del>-</del>	-	-	1,00	0,45
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	<del>-</del>	-		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	-	-	<del>-</del>		
	ацетон	-	-	-	-		
Сумма МНЖК	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	<del>-</del>	-	+	37,3	5,6·10 <sup>-3</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>-</del>	+		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	+	+	<del>-</del>		
	ацетон	-	+	+	-		
Сумма ПНЖК	0,1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	<del>-</del>	-	+	65,5	3,9·10 <sup>-7</sup>
	1 мкг·л <sup>-1</sup>	+	-	<del>-</del>	+		
	10 мкг·л <sup>-1</sup>	-	+	+	<del>-</del>		
	ацетон	-	+	+	-		

Примечание: «+» — значимые отличия ( $p = 0,05$ ); «-» — отсутствие значимых отличий ( $p = 0,05$ ); *F* — критерий Фишера; *p* — вероятность. Жирным шрифтом выделены кислоты, имеющие статистически значимые отличия ЖК-состава липидов.

Для трохофор мидий показано, что суммарная концентрация НЖК практически не изменяется при концентрациях ПХБ в среде выращивания личинок

от 0 до 10 мкг·л<sup>-1</sup>. Суммарное содержание НЖК в личинках, подверженных влиянию ПХБ, изменяется от 52,2% до 65,3%.

Основные идентифицированные НЖК в трохофорах мидии *M. galloprovincialis* представлены пальмитиновой (C16:0) (от 35% до 39%) и стеариновой (C18:0) (от 8% до 14%) кислотами. НЖК с числом углеродных атомов 14 и 15 составляют от 4% до 7%. Сравнительно высокий уровень НЖК в трохофорах связан с высокой метаболической активностью у моллюсков в нерестовый весенний период. Так, при изучении ЖК-состава жемчужной устрицы *Pinctada fucata martensii* выяснили, что основную часть насыщенных ЖК составляли миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты [218, 219].

Миристиновая кислота (C14:0) у животных редко выступает в качестве основного компонента. Её содержание в личинках составило от 5,7% до 7,7%. Накопление пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот в трохофорах мидии *M. galloprovincialis* указывает на их участие в поддержании целостности структуры мембран, поскольку у двустворчатых моллюсков данные кислоты в основном входят в состав фосфолипидов мембран [62].

В наших исследованиях в личинках мидии *M. galloprovincialis* среди наиболее распространенных МНЖК обнаружены: пальмитолеиновая (C16:1 $\omega$ 7), олеиновая (C18:1 $\omega$ 9) и вакценовая (C18:1 $\omega$ 7) кислоты. Пальмитолеиновая (C16:1 $\omega$ 7) и олеиновая (C18:1 $\omega$ 9) ЖК образуются из пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот. Вакценовая (C18:1 $\omega$ 7) кислота, по-видимому, является одним из изомеров октадеценовых кислот [62]. Кроме этого, наличие *cis*-вакценовой (C18:1 $\omega$ 7) кислоты, биосинтезируемой анаэробными бактериями [102], указывает на вклад бактерий в питание трохофор.

Повышенное содержание незаменимой олеиновой (C18:1 $\omega$ 9) кислоты в трохофорах двустворчатых моллюсков может быть связано с её дополнительным синтезом под токсическим воздействием загрязняющих веществ с целью связывания

и детоксикации ксенобиотических веществ [121]. Наименьшее содержание стеариновой (C18:0) кислоты в личинках наблюдается при воздействии 0,1 ПДК ПХБ (рисунок 4.4). Под действием 1 ПДК и 10 ПДК ПХБ концентрации стеариновой (C18:0) кислоты практически не отличаются, но становятся ниже, чем в контрольном образце и в пробе с ацетоном. Это показывает, что личинки быстро реагируют на малейшие воздействия поллютантов, снижая проницаемость плазматических мембран, снижая губительное воздействие ПХБ. Содержание МНЖК в трохофорах снижается примерно в 2 раза относительно контроля при концентрациях ПХБ 0,1 и 1  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ , в то время как концентрации ПНЖК увеличиваются в 3 раза при концентрации ПХБ, равной 0,1  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ; увеличивается в 2,5 раза при концентрации ПХБ 1  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ ; и возрастает в 1,3 раза при — 10  $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ .

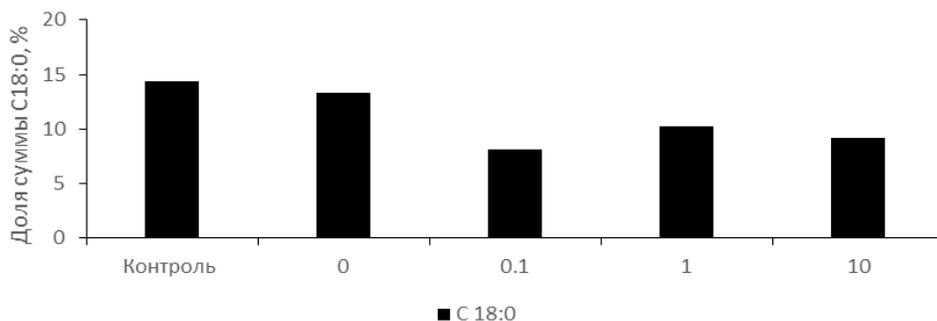


Рисунок 4.4 — Схематичное усредненное содержание стеариновой (C18:0) кислоты в личинках мидии *Mytilus galloprovincialis* в зависимости от загрязненности ПХБ среды выращивания

На рисунке 4.5 представлена гистограмма изменения процентного содержания суммы (C18:1) кислот в зависимости от загрязненности ПХБ среды выращивания.

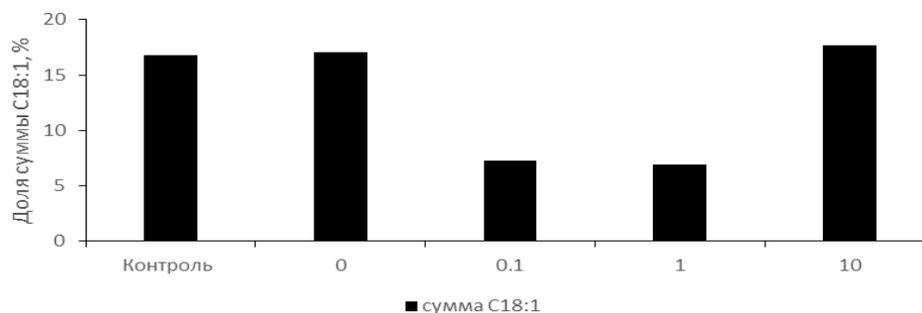


Рисунок 4.5 — Схематичное усредненное содержание (C18:1) кислот в личинках мидии *Mytilus galloprovincialis* в зависимости от загрязненности ПХБ среды выращивания

В личинках олеиновая (*цис*-9-октадеценовая) (C18:1 $\omega$ 9) кислота имеет 2 возможных происхождения: экзогенное при потреблении диатомовых водорослей и эндогенное, через превращение пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот [109]. Повышение уровня (C18:1) кислот может свидетельствовать об усиленном метаболизме в клетках личинок [62]. При содержании ПХБ, равным 0,1 и 1 мкг·л<sup>-1</sup>, происходит уменьшение концентрации (C18:1) кислот по сравнению с контрольным опытом в более чем в два раза, а при 10 мкг·л<sup>-1</sup> концентрация (C18:1) кислот равна их концентрации в контроле.

Возможно, при невысоких концентрациях ПХБ изменение концентрации МНЖК вызвано действием нескольких каталитических механизмов, включающих механизмы перекисного окисления, в дополнение к цитохром Р450 монооксигеназному пути. Ферменты системы цитохром Р450 гидроксилирует связи С-Н субстратов, катализируют омега-окисление насыщенных жирных кислот и перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот [62]. Изменения долей МНЖК и ПНЖК при почти неизменной доли НЖК под действием ПХБ можно объяснить биосинтезом ненасыщенных ЖК из насыщенных. Имеющие больше двойных связей в своих молекулах жирные кислоты образуют более рыхлую структуру липидного бислоя. ПНЖК имеют более низкие точки плавления, по сравнению с насыщенными

кислотами. Ассиметричное строение и температура плавления — две основные характеристики полиенов, которые увеличивают текучесть биологических мембран и, соответственно, обуславливают их высокую метаболическую активность [62]. До закладки пищеварительных органов личинки мидий ранних стадий находятся на пассивном питании, при этом ЖК в основном используются для формирования биомембран и запасных липидов [65, 66, 171].

Увеличение концентрации ПНЖК связано с защитной функцией трохофор на загрязнение среды обитания. Действие поллютантов может прямо, особенно на ранней стадии онтогенеза, или опосредовано, через изменения вещественно-энергетических потоков в экосистеме, влиять на резистентность и толерантность культивируемых организмов. Изменение концентрации арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты: от 1,3% в контроле до 20,5% при воздействии 0,1 ПДК полихлорбифенилов, может быть обусловлено её способностью выступать в качестве гормона, активируя рецепторы клеток, играя при этом важную роль в иммунном ответе. При более высоких концентрациях полихлорбифенилов: 1 ПДК и 10 ПДК, содержание арахидоновой кислоты снижается, что свидетельствует о её интенсивном использовании в ферментативных процессах [62].

Среди ПНЖК в личинках удалось идентифицировать арахидоновую (C20:4 $\omega$ 6), эйкозапентаеновую (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновую (C22:6 $\omega$ 3) кислоты. Содержание омега-3 и омега-6 кислот в личинках мидий не превышало 12,8%. Концентрация незаменимой арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты в трохофорах не является величиной постоянной и варьирует от 1% до 21%. Например, в гастроподах концентрация арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты достигала лишь 5,73% [171]. Как известно, живые организмы могут синтезировать арахидоновую (C20:4 $\omega$ 6) кислоту из незаменимой омега-6-ненасыщенной линолевой (C18:2 $\omega$ 6) кислоты [10]. Так как в личинках мидии *M. galloprovincialis* линолевая кислота (C18:2 $\omega$ 6) обнаружена нами практически в каждой пробе, возможно, она необходима для дальнейшего

биосинтеза арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) кислоты на дальнейших стадиях развития. Арахидоновая кислота (C20:4 $\omega$ 6) также является основным компонентом мембранных фосфолипидов у всех животных [62].

ПНЖК участвуют в адаптации организма к окружающей среде, обладают разнообразной биологической активностью. Большинство беспозвоночных не способны синтезировать ПНЖК и получают их с пищей, обеспечивая свои потребности в этих эссенциальных компонентах для поддержания нормального функционирования организма [204]. Эйкозапентаеновая (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновая кислоты (C22:6 $\omega$ 3) — основные ЖК морских водорослей [193, 205, 218, 219]. Содержание эйкозапентаеновой кислоты (C20:5 $\omega$ 3) во всех образцах личинок было невысоким и не превышало 4,5% [154]. Возможно, это связано с условиями окружающей среды и питанием моллюсков, обитающих в Чёрном море.

На рисунке 4.6 представлена диаграмма зависимости содержания НЖК, МНЖК и ПНЖК в трохофорах мидий в зависимости от концентрации ПХБ в среде выращивания.

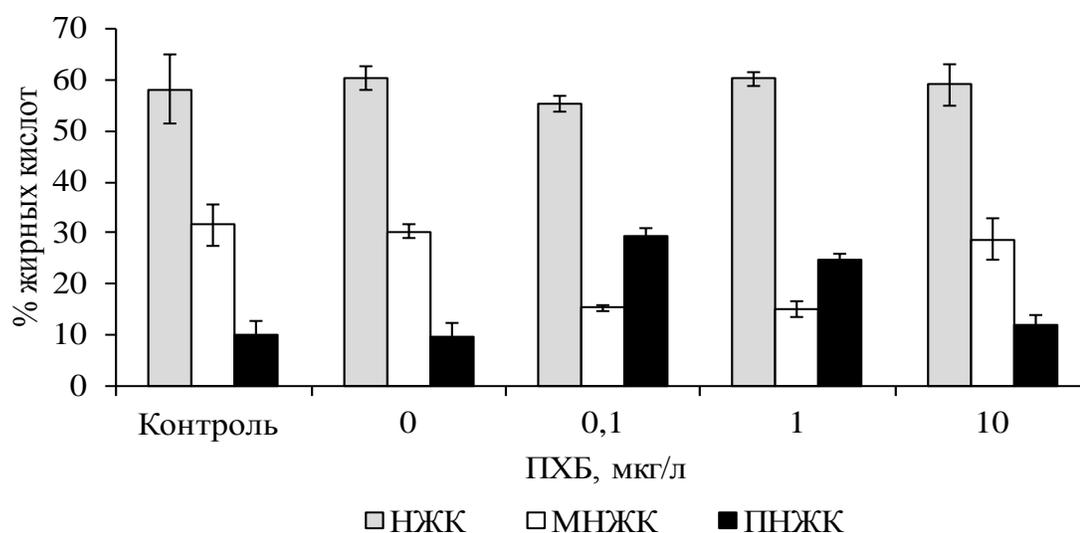


Рисунок 4.6 — Содержание жирных кислот в трохофорах мидии *Mytilus galloprovincialis* в зависимости от загрязненности среды ПХБ

Действие ПХБ на трохофоры мидий аналогичны воздействию органических загрязнителей на гонады и половые продукты. При низких и средних концентрациях поллютантов увеличивается содержание ПНЖК, а при высоких — ЖК-отклик личинок практически не отличается от контроля. Изменяется содержание лишь некоторых НЖК: пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0). Это связано с ведущей ролью этих кислот в связывании как стероидных гормонов, так и органических поллютантов. Находясь на пассивном питании, личинки могут поглощать и загрязнители, и стероидные гормоны из среды обитания.

**Заключение по 4 главе.** В гонадах и половых продуктах мидии *M. galloprovincialis* методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы 22 ЖК. Состав ЖК в гонадах зависит от стадии репродуктивного цикла мидий. Максимальная концентрация суммарных ЖК зафиксирована на первой стадии репродуктивного цикла. Снижение концентрации отмечено на второй стадии и рост на третьей, что согласуется с изменением концентраций стероидов в гонадах. С первой по четвертую стадию репродуктивного цикла в гонадах самок преобладают НЖК. В гонадах самцов, начиная со второй стадии, МНЖК и ПНЖК преобладают над другими жирными кислотами. В гонадах самок МНЖК и ПНЖК обнаружены на 4 и 5 стадиях репродуктивного цикла.

Особую ценность для биотехнологических целей представляют половые продукты мидии *M. galloprovincialis*, в которых относительное содержание МНЖК и ПНЖК достигает максимальных значений по сравнению с гонадами. В яйцеклетках содержание НЖК выше, чем в сперматозоидах. ПНЖК в сперматозоидах доминируют над НЖК и МНЖК. Жирные кислоты, содержащиеся в половых продуктах мидии *M. galloprovincialis*, вероятно, могут использоваться другими гидробионтами, так как со спермой и яйцеклетками в водную среду выделяться до 50% ПНЖК, тогда как в личинках этот показатель не превышает 10%.

Впервые определено влияние нереста на изменение уровня загрязненности гонад и половых продуктов ХОС. До и после нереста в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах культивируемых мидий обнаружены пять конгенов ПХБ и ДДТ и его метаболиты: ДДЭ и ДДД. Концентрация ПХБ в пробах более чем в 70 раз превышает содержание ДДТ и его метаболитов и составляет от 97% до 100% суммы ХОС. Это показывает о том, что среда обитания мидий загрязнена хлорорганическими токсикантами. Наибольшие концентрации определены для высокохлорированных ПХБ 101, 138 и 153. Уровень биоаккумуляции ХОС в гонадах зависит как от их концентрации в воде, так и физиологического состояния, а именно от содержания жирных кислот, которое определяется репродуктивным статусом моллюсков. Вымет половых продуктов уменьшает содержание ХОС в гонадах мидий вследствие передачи ХОС в яйцеклетки и сперматозоиды, и с ними — в морскую среду.

В целом, сумма концентраций ХОС в гонадах и половых продуктах мидии *M. galloprovincialis* не превышает санитарно-эпидемиологические нормы РФ для морепродуктов [49].

ЖК-состав личинок мидий в значительной мере зависит от степени загрязненности среды их обитания ПХБ. На примере трохофор рассмотрено влияние ПХБ на ЖК-состав, а значит на стероидный состав мидий, так как стероиды этерифицируются преимущественно НЖК. Увеличение концентрации ненасыщенных жирных кислот и снижение доли НЖК в пробах под воздействием даже минимальных концентраций загрязнителя говорит о защитной реакции организма личинок. При концентрации ПХБ порядка  $10 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  наблюдается минимальный ЖК-отклик, так как эта концентрация губительна для живого организма. Уровни стеариновой (С18:0) НЖК и суммы двух изомеров октадеценовых (С18:1) МНЖК резко снижаются при воздействии даже  $0,1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  ПХБ, а процентное содержание суммы двух изомеров октадеценовых (С18:1) кислот

возрастает в 3 раза при увеличении концентрации ПХБ до  $10 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ . Снижение уровня НЖК и увеличение МНЖК связано с биохимическими процессами, например, окислением, происходящими в молекулах ЖК, входящих в структуру клеточных мембран личинок. Содержание ПНЖК, например, арахидоновой ( $\text{C}_{20:4\omega 6}$ ), напротив, увеличивается при действии  $0,1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  ПХБ, что, вероятно, связано с ее способностью выступать в качестве гормона в иммунном ответе.

Сведения, полученные при изучении влияния концентрации поллютантов на ЖК-состав трохофор мидий, особенно полезны для расчёта оптимального получения БАВ. При создании лечебно-профилактических продуктов определить точную дозировку гормонов, при которой возможен максимальный отклик организма, представляет сложную задачу. Используя в экспериментах личинки мидий и зная концентрацию БАВ в среде выращивания, можно подобрать условия, при которых доля ценных ПНЖК будет максимальной. Именно этот показатель определяет отклик организма на воздействие БАВ. Несложно пересчитать концентрацию воздействия БАВ на сухую массу личинок, а затем экстраполировать эти данные на массу тканей животных или человека.

## ГЛАВА 5 СОДЕРЖАНИЕ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

### 5.1 Элементный состав гонад, половых продуктов и трохофор черных и коричневых цветковых морф мидий

Двустворчатый моллюск *M. galloprovincialis* — важный компонент прибрежных морских экосистем. Он обладает высоким потенциалом поглощения элементов из воды [122, 210, 211, 251, 252]. Накопленные в тканях элементы могут превышать их концентрации в окружающей среде на несколько порядков [98].

Элементный состав моллюсков изучают, в основном, в тканях и створках, но до сих пор отсутствуют сведения о накоплении макро- и микроэлементов на протяжении всего жизненного цикла мидий, относящимся к разным цветковым морфам, включая их половые продукты и личинки. Изменение элементного состава в процессе нереста черной и коричневой морф мидии также еще не изучено.

Макроэлементы, включаются в различные биофизические и биохимические процессы и поэтому являются незаменимыми для поддержания жизни. Недостаток даже одного из эссенциальных элементов в организме может остановить его рост или репродукцию [91]. В организме моллюсков макроэлементы являются структурными компонентами основных органических веществ: белков (С, Н, О, N, S); липидов (С, Н, О, Р, N); углеводов (С, Н, О). С биогенными элементами главным образом связан круговорот компонентов органического вещества от неорганических соединений через живое органическое вещество до неорганических продуктов минерализации. В качестве живого органического вещества могут выступать гонады самцов и самок, находящиеся на пятой стадии репродуктивного цикла, сперматозоиды, яйцеклетки и трохофоры коричневых и черных мидий *M. galloprovincialis* (табл. 5.1).

Изучая макро- и микроэлементный состав самцов и самок перед нерестом, половых продуктов и личинок черных и коричневых цветовых морф мидии *M. galloprovincialis*, можно выявить, на какой стадии развития моллюсков отличия в элементном составе могут быть максимальны [15].

Экспериментальные данные по содержанию макроэлементов, полученные на энергодисперсионном рентгеновском анализаторе электронного микроскопа (СЭМ), пересчитывали на массу органического вещества, состоящего из углерода, кислорода, азота, фосфора и серы. Поскольку водород не имеет характеристических пиков в рентгеновском спектре, исходя из имеющихся литературных данных [68, 76, 155, 158], рассчитали минимально (6,06%) и максимально (6,56%) возможное содержание водорода в органических веществах (белках, липидах и углеводах (в виде гликогена)) суммарных мягких тканей мидии. В пересчете на максимальное или минимальное содержание водорода результаты статистического анализа не отличались. В таблице 5.1 указана масса элементов в гонадах, половых продуктах и трохофорах мидий с учетом среднего между минимальным и максимальным содержанием водорода в органических веществах.

**Углерод.** Различий в содержании углерода в гонадах черных и коричневых цветовых морф мидий не обнаружено. При этом в гонадах самцов черных мидий углерода на 10% меньше, чем в гонадах самок коричневых мидий. Установлено, что содержание белка в гонадах мидий черного фенотипа достоверно выше, чем в гонадах мидий, относящихся к коричневой морфе:  $27,83 \pm 0,38\%$  и  $16,08 \pm 0,45\%$ , соответственно [68].

Таблица 5.1 — Макроэлементный состав и значимые различия ( $p < 0,05$ ,  $n = 15$ ) в элементном составе (С, О, N, P, S) черной и коричневой цветовых морф мидии *Mytilus galloprovincialis*

Элементы	Г. ♂♂ кор.	Г. ♂♂ чер.	Г. ♀♀ кор.	Г. ♀♀ чер.	Сп. кор.	Сп. чер.	Я. кор.	Я. чер.	Т. кор.	Т. чер.
	Массовая доля, %									
С	55,7±2,0	52±0,6	65,5±5,7	59,5±4,9	57,7±1,0	57,1±6,3	77,5±1,0*	55,7±1,4*	58,1±6,6*	81,4±0,4*
О	24,0±0,3	25±0,6	20,1±3,7	22,8±3,2	19,7±1,6	16,8±1,5	12,9±1,4*	24,1±0,2*	22,4±3,5*	2,5±0,1*
N	10,0±2,0	13±0,6	5,4±1,7	8,7±2,5	11,4±0,1*	3,0±1,2*	1,8±0,8*	11,1±1,0*	9,9±3,2*	<0,1*
P	2,0±0,3	2,5±0,5	1,3±0,4	1,4±0,5	4,6±0,6*	<0,1*	0,5±0,1	1,4±0,1	1,5±2,5	<0,1
S	1,5±0,4	1,1±0,2	1,1±0,4	1,3±0,4	0,6±0,1*	3,1±2,3*	0,4±0,1	1,3±0,1	1,1±0,3	0,1±0,1
Значимые различия ( $p < 0,05$ , $n = 15$ ) в элементном составе (по С, О, N, P, S)										
Г. ♂♂ кор.					P	N	C, O, N, P			C, O, N, P
Г. ♂♂ чер.			C, N		P	O, N, P, S	C, O, P			C, O, N, P
Г. ♀♀ кор.		C, N			N, P	S	O			C, O
Г. ♀♀ чер.					P	N	C, O			C, O, N
Сп. кор.	P	P	N, P	P		N, P, S	C, O, N, P	P	P	C, O, N, P
Сп. чер.	N	O, N, P, S	S	N	N, P, S		C, O, S	N	N, S	C, O, S
Я. кор.	C, O, N, P	C, O, N, P	O	C, O, N	C, O, N, P	C, S		C, O, N	C, O, N	O
Я. чер.					P	N	C, O, N			C, O, N
Т. кор.					P	N, S	C, O			C, O, N
Т. чер.	C, P	C, N, P	C	C, N	C, N, P	C, S	C, O	C, N	C, N	

Примечание: кор. — коричневая цветовая морфа раковин мидий; чер. — черная цветовая морфа раковин мидий; ± — доверительный интервал с вероятностью 95% ( $n = 15$ ); Г. — гонады; Сп. — сперматозоиды; Я. — яйцеклетки; Т. — трохофоры; кор. — коричневая цветовая морфа раковин мидий; чер. — черная цветовая морфа раковин мидий; \* — достоверные различия между цветовыми морфами ( $p < 0,05$ ,  $n = 15$ ).

В сперматозоидах коричневой и черной морф мидии *M. galloprovincialis* количество углерода одинаковое ( $58,0 \pm 0,5\%$  и  $57 \pm 3\%$ ), но наблюдаются статистически значимые различия по N, P и S. В яйцеклетках коричневой морфы содержание углерода выше, чем в черной, что, вероятно, связано с ЖК-составом половых продуктов мидий [155]. В яйцеклетках коричневой морфы содержание углерода выше, чем в гонадах и сперматозоидах, что может быть вызвано высоким содержанием насыщенных жирных кислот в яйцеклетках. В яйцеклетках коричневой морфы углерода больше на 20%, чем в яйцеклетках черных мидий.

Различия в элементном составе коричневой и черной морф мидий наиболее заметны в половых продуктах и трохофорах (табл. 5.1). В личинках черных мидий содержание углерода на 30% выше, чем в личинках коричневых моллюсков. Вероятно, в гонадах черных мидий продукты распада белков и жиров интенсивнее превращаются в гликоген, который потребляется трохофорами, находящимися первые 72 часа на пассивном питании. Отличия могут быть также связаны с количеством аминокислот в личинках и у взрослых особей. Так, во время личиночного развития у двух видов моллюсков *Haliotis rufescens* и *Crassostrea gigas* отмечен более высокий синтез таурина, чем у взрослых особей. Кормление личинок в 11 раз активировало синтез таурина [255].

В яйцеклетках коричневой морфы содержание углерода выше, чем в гонадах и сперматозоидах, что говорит о высоком содержании насыщенных жирных кислот в яйцеклетках [155]. В яйцеклетках коричневой морфы углерода больше на 20%, чем в яйцеклетках черных мидий. Мидии, имеющие коричневую окраску раковин, продуцируют яйцеклетки более крупного размера, чем черные [67].

Размеры яйцеклеток мидий являются важной характеристикой их успешного эмбриогенеза и выживаемости, так как личинки до перехода на внешнее питание живут и развиваются за счёт энергетических запасов яиц [65].

Биохимические особенности моллюсков, обладающих разным цветом створок, объясняются наличием генетической неоднородности между ними [232].

**Кислород.** В гонадах самцов и самок и сперматозоидах черных и коричневых цветовых морф мидий примерно одинаковое количество кислорода. В яйцеклетках коричневых мидий кислорода в два раза меньше, а в трохофорах на порядок больше, чем в черных моллюсках. Так как кислорода больше всего в углеводах и, например, в аденозинтрифосфате (АТФ), то в яйцеклетках коричневых мидий относительно больше жиров, а в яйцеклетках черных — углеводов (или эфиров фосфорной кислоты). В трохофорах — обратная зависимость. Это может быть связано с тем, что трохофоры находятся на пассивном питании, и, например, уровень эйкозапентаеновой ( $C_{20:5\omega 3}$ ) и докозагексаеновой ( $C_{22:6\omega 3}$ ) кислот низкий [155]. Например, докозагексаеновая ( $C_{22:6\omega 3}$ ) кислота может влиять на активность Na/K-АТФазы — фермента клеточных мембран, который избирательно выкачивает из клетки ионы натрия и аккумулирует в ней ионы калия. Создаваемая ферментом разница концентраций одновалентных катионов имеет важное значение для регуляции клеточного метаболизма.

**Азот.** В гонадах самцов черных и коричневых цветовых морф содержание азота практически в два раза больше, чем у самок. Это связано с тем, что липиды гонад самок состоят преимущественно из насыщенных жирных кислот [155]. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий азота на порядок больше, чем в черных. В яйцеклетках наоборот, содержание насыщенных жирных кислот в яйцеклетках в полтора раза выше, чем в сперматозоидах. Повышенное содержание азота в сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий можно объяснить различием в аминокислотном составе половых продуктов черной и коричневой морф.

**Фосфор.** В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий фосфора больше, чем в черных. В яйцеклетках — наоборот. Гонады самцов мидий имеют более

высокое содержание фосфора по сравнению с самками. Очевидно, данная особенность должна быть связана с повышенной концентрацией фосфатных эфиров, в первую очередь, аденозинтрифосфата (АТФ) — основного источника энергии сперматозоидов [74]. В Чёрном море фосфаты доминируют среди других значимых макроэлементов, за исключением сильно опресненных районов. Содержание фосфора может колебаться в широких пределах, а на глубине возрастает. Сезонные колебания содержания фосфора выражены довольно четко как в глубоководных, так и в мелководных районах. Минимум обыкновенно отмечается летом, а максимум — зимой [9].

**Сера.** В сперматозоидах черных мидий серы в несколько раз больше, чем в коричневых. Вероятно, это связано с повышенным содержанием серосодержащих аминокислот в черных моллюсках (цистеина, метионина, цистина). Из всех серосодержащих аминокислот наибольшее значение имеет метионин, который относится к числу незаменимых факторов питания. Важным свойством метионина является превращение его в цистеин и цистин, являющихся структурными единицами белков, активных центров ферментов и ряда гормонов (инсулин, окситоцин и др.) [2]. Уже доказано, что в мидиях, относящихся к черной цветовой морфе, содержание белка выше [230]. В трохофорах коричневых и черных мидий значимых отличий в содержании серы не найдено. Поскольку таурин был обнаружен только в морских моллюсках, проведено сравнение метаболизма серы у мидии *M. edulis* и моллюска *Rangia cuneata* [73]. Обнаружено, что оба вида могут преобразовывать метионин в цистеин, вероятно, таким же образом, как и млекопитающие. Цистеин окислялся до продуктов, дающих начало синтезу таурина, но с принципиальными отличиями. Одно отличие заключалось в механизме окисления цистеина в таурин. У *R. cuneata* наблюдали большое количество меченой цистеиновой кислоты, образующейся при окислении цистеина, что указывало на дальнейшее окисление цистеинсульфиновой кислоты в цистеиновую кислоту, в

результате декарбоксилирования которой образуется таурин. Одним из важных путей обмена цистеина является окисление его в цистеинсульфиновую кислоту. В *M. edulis* цистеиновая кислота не образовывалась, но возникал меченный промежуточный продукт — гипотаурин (сульфиновая кислота, которая является промежуточным звеном в биосинтезе таурина). У *M. edulis* таурин образовывался и оставался в тканях, в то время как у *R. cuneata*, таурин возникал, но в течение нескольких часов исчезал из организма, видимо, из-за невозможности синтезировать его.

О структурных особенностях распределения микроэлементов в гонадах, половых продуктах и личинках коричневых и черных мидий можно судить на основании микрофотографий, сделанных на сканирующем электронном микроскопе. На рис. 5.1 показано распределение элементов в половых продуктах и трохофорах мидии *M. galloprovincialis* в сканирующем электронном микроскопе. Для наглядности на рис. 1a–j представлены наиболее подходящие масштабы сканирования. Структурные различия фаз проявляются достаточно четко. Микроэлементы характеризуются развитой микроглобулярной поверхностью (рис. 5.1f и 5.1i). Отличаются выраженной микрослоистостью, имеют ступенчатую форму (рис. 5.1a; 5.1d или 5.1h и 5.1j), что свидетельствует о последовательной аккумуляции элементов.

Цветные узоры тканей гонад самцов и самок, половых продуктов и личинок черных и коричневых цветовых морф моллюсков отличаются по секторам различной ширины концентрических полос, пятен, шевронов или зигзагообразных сложных мозаик, состоящих из геометрических фигур разных размеров. Во-первых, это может быть связано с различной структурой тканей. Во-вторых, особенно отличаются по цвету и структуре сперматозоиды, яйцеклетки и трохофоры мидий, принадлежащие к разным цветовым морфам.

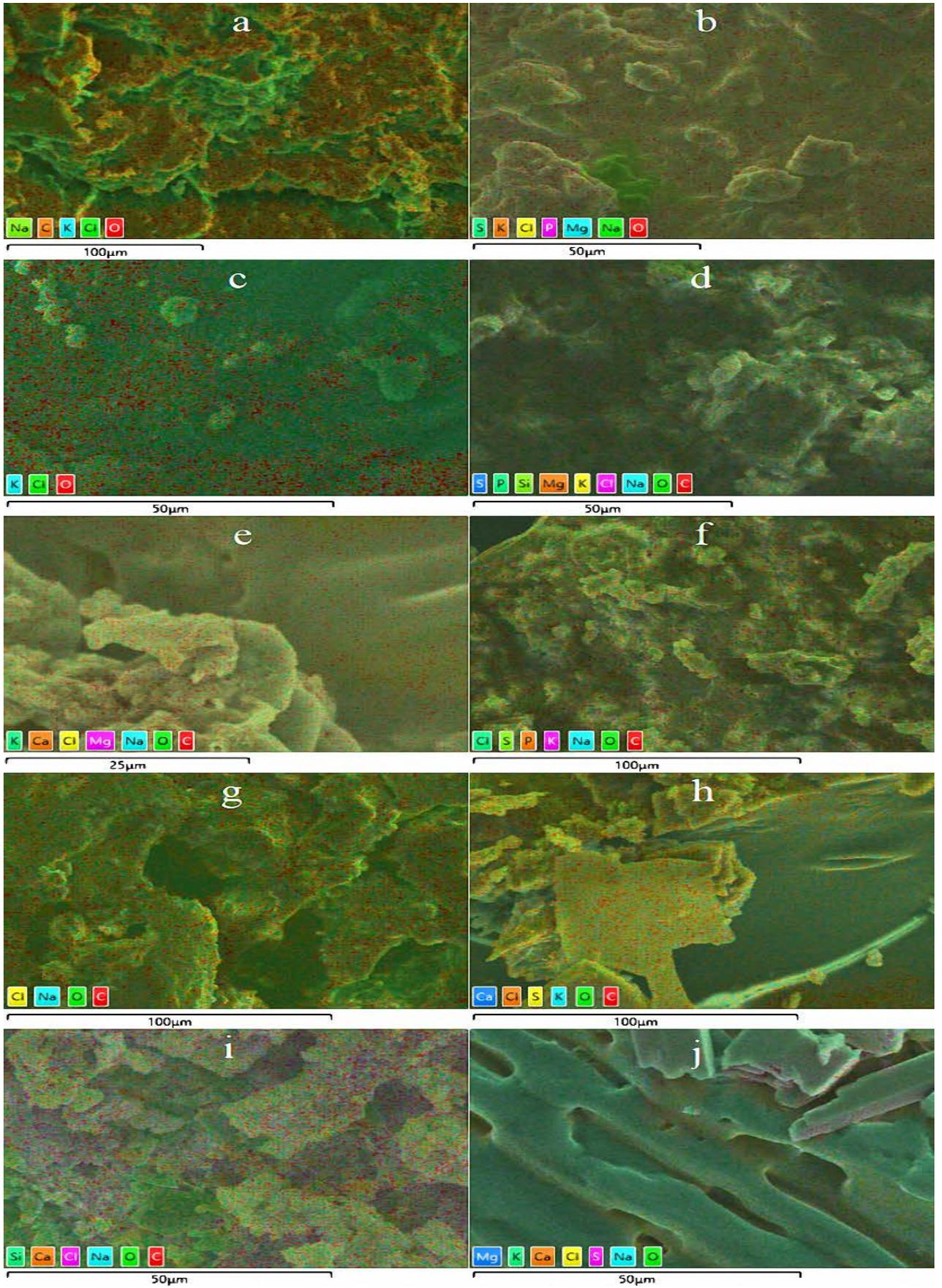


Рисунок 5.1 — Микрофотографии в СЭМ гонад, половых продуктов и трохофор мидии *Mytilus galloprovincialis*: a — гонады ♂♂ коричневой цветовой морфы, b — гонады ♂♂ черной цветовой морфы, c — гонады ♀♀ коричневой цветовой морфы, d — гонады ♀♀ черной цветовой морфы, e — сперматозоиды коричневой цветовой морфы, f — сперматозоиды черной цветовой морфы, g — яйцеклетки коричневой цветовой морфы, h — яйцеклетки черной цветовой морфы, i — трохофоры коричневой цветовой морфы, j — трохофоры черной цветовой морфы

Красным цветом на зеленом фоне обозначены зоны с максимальным содержанием кислорода. Возможно, это вызвано тем, что содержание гликогена и сахаров в гонадах самцов коричневых и черных мидий различное. Представленные изображения отличаются текстурой поверхности. Образцы, относящиеся к черной морфе, более текстуированы. На всех изображениях отчетливо видны оттенки от бледно-зеленого (рис. 5.1d) до темно-фиолетового (рис. 5.1i) и изумрудного (рис. 5.1j) цвета, что показывает различия в элементном составе гонад, половых продуктов и личинок черной и коричневой морф. Отмечены фиолетовые включения различного размера в трохофорах мидий (рис. 5.1i и 5.1j). Эти включения можно наблюдать на зеленом фоне (рис. 5.1a–h). Вероятно, это факт свидетельствует об ответной реакции трохофор на влияние экзогенных факторов, например, солености, температуры [89] или загрязнения водной среды [154].

У трохофор черных мидий фиолетовым цветом обозначены атомы серы (рис. 5.1j). Массовая доля серы у коричневых мидий на порядок больше, чем в черных:  $1,1 \pm 0,1\%$  и  $0,1 \pm 0,1\%$ . Различия двух морф по элементному составу обусловлены биохимическими характеристиками их тканей. Наблюдается выраженная зависимость активности эндогенного фермента аспартаминотрансферазы от цвета раковины: у коричневых особей активность аспартатаминотрансферазы (АСТ) выше, что связано с особенностями условий обитания черных и коричневых цветковых

морф мидий [161, 162]. Исследования активности альдолазы (фермента, используемого для превращения глюкозы в энергию) в тканях мидии *M. galloprovincialis* с различным цветом раковин показало, что в жабрах темно-коричневых мидий активность альдолазы ниже, чем у черных и коричневых цветковых морф мидий. При этом допускалось, что данное явление могло быть связано с адаптацией моллюсков к условиям скальных и донных экотопов [161, 162].

Цветовые морфы характерны и для других видов морских моллюсков. Так, при изучении размерно-возрастных и фенотипических особенностей соматического роста черноморского гребешка выделено 7 цветковых морф [230]. Бежевый, фиолетовый и серо-коричневый фенотипы характеризовались высоким уровнем синтеза белковых структур. Моллюски, относящиеся к фенотипу смешанного типа «мульти», имели самые низкие показатели тканевого биосинтеза, в среднем в 2,5 раза ниже, чем у представителей других морф. Полученные результаты свидетельствуют о сопряженности ростовых процессов, в которых непосредственное участие принимают макро- и микроэлементы, с окрасом раковин моллюска. Так, окраска раковины мидий зависит от гемэритрина — фиолетового пигмента, что, вероятно, связано с экспрессией определенных генов.

При изучении цвета раковин устриц впервые обнаружили эндогенные порфирины, определяющие пигментацию раковин устриц *Crassostrea gigas* [89]. Наличие гемов, чьими предшественниками являются порфирины, объясняло пурпурный цвет раковин, а также темный цвет мышц моллюсков. Эти исследования показали, что различный окрас раковин устриц связан с трансляцией генов, так как у некоторых устриц обнаружены неактивные гены, которые не могли приводить к экспрессии определенного белка. Однако еще не доказано, является ли это наблюдение результатом эволюции или адаптацией к определенной среде.

Мидии накапливают высокие уровни металлов независимо от того, являются ли эти элементы незаменимыми для их метаболизма или токсичными (табл. 5.2). В

целом, большее количество многих элементов накапливается в гонадах самок мидий, что согласуется с результатами измерений макро- и микроэлементов в их мягких тканях в преднерестовый период [9]. Как пищевой, так и водный пути играют важную роль в накоплении микроэлементов. В природе эти процессы происходят одновременно.

Особое внимание следует уделить элементам, которые, вероятно, играют существенную функциональную роль в гаметогенезе мидий. Из всех микроэлементов, представленных в табл. 5.2, наибольший интерес вызывают Zn и Se, так как именно эти элементы участвуют в размножении моллюсков. Так, гонады самок отличаются от гонад самцов повышенным содержанием As и Zn на многих стадиях репродуктивного цикла (за исключением стадии 4). Это дает сильный довод в пользу биохимической вовлеченности Zn в оогенез мидий [177].

Zn важен для всех форм жизни. Особенно много его в тканях морских животных. Известна специфическая функция Zn в репродуктивной системе амфибий, например, существование «цинковых искр», контролирующих оплодотворение [228]. В организме животных он используется для активации ферментов, синтеза ДНК и белков, а также для поддержки функций репродуктивной системы. Изменение массы тканей и раковин мидии *M. galloprovincialis* связано с различными уровнями Zn. Так, вес раковин, загрязненных Zn, значительно увеличился после 51-дневного периода очистки [234]. Избыток Zn нарушает ферментативные реакции у гидробионтов [114].

Таблица 5.2 — Концентрация некоторых микроэлементов в черных и коричневых цветовых морфах мидии *Mytilus galloprovincialis*

Объект	Концентрация некоторых микроэлементов, мкг·г <sup>-1</sup> <sub>сух.</sub>																	
	Cu		As		Fe		Al		Mg		Ca		Si		Se		Zn	
	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.
Г ♂♂	80± 9	95± 12	7,0± 0,4*	15± 3*	65± 8	55± 4	50± 3*	30± 2*	757± 230*	450± 30*	115± 26	71± 12	30± 10	22± 5	1,0± 0,1	1,0± 0,1	17± 3	20± 1
Г ♀♀	347± 65*	173± 14*	14± 1	18± 5	117± 33	145± 24	73± 13	84± 13	398± 54*	207± 46*	91± 25	53± 18	46± 12	42± 9	2,0± 0,4*	0,7± 0,1*	57± 8	51± 10
Сп.	764± 99*	2139± 256*	29± 5*	3± 1*	189± 20*	232± 16*	253± 13*	473± 13*	171± 28*	1292± 136*	363± 65*	233± 48*	95± 15	110± 30	2,0± 0,1*	0,6± 0,1*	28± 1*	62± 12*
Я	373± 89*	213± 13*	12± 3	17± 3	83± 16	52± 11	137± 24*	63± 9*	141± 19	163± 37	139± 12*	94± 13*	63± 2	44± 6	0,5± 0,1*	1,0± 0,1*	45± 2	56± 10
Т	613± 14*	439± 42*	н. о.	0,3± 0,2	49± 2*	75± 11*	103± 2	106± 12	45± 11*	109± 9*	93± 2*	239± 17*	26± 9	28± 5	0,3± 0,1	0,8± 0,4	2,0± 0,1*	5,0± 0,1*

Примечание: данные представлены как среднее ± доверительный интервал с вероятностью 95%, n = 15); н. о. — не обнаружено; кор. – коричневая цветовая морфа раковины мидии; чер. — черная цветовая морфа раковины мидии; Г ♂♂ — гонады самцов; Г ♀♀ — гонады самок; Сп. — сперматозоиды; Я — яйцеклетки; Т — трохофоры; \* — достоверные различия между морфами (p < 0,05, n = 15).

В гонадах и личинках черной морфы содержание Zn больше, чем в коричневых мидиях. Наблюдается отличие концентраций в аналогичных тканях самцов и самок мидий. Но только по этим данным нельзя установить, с какими субклеточными структурами или биохимическими процессами связаны более высокие концентрации элементов. Вероятно, соленость морской воды распределена неравномерно, поэтому перенос моллюсков или личинок из низкой солености в высокую или из высокой в низкую, что приводит к изменению элементного состава.

Наиболее явные отличия в содержании Zn можно наблюдать в сперматозоидах, яйцеклетках и трохофорах. В гонадах самцов и самок содержание Zn примерно одинаковое. Видимо, мидии поглощая микроэлементы, в том числе Zn, из окружающей среды, где они, подобно стероидным гормонам, депонируются в мягких тканях, а затем экскретируются вместе с половыми продуктами [16, 86, 186].

Различия в распределении Se между органами мидий, и его влияние на репродуктивную функцию плохо изучены. Концентрации Se в гонадах и половых продуктах изменяются аналогично концентрациям стероидных гормонов [195] и зависят от репродуктивного цикла моллюсков [125]. Se и селенопротеины обеспечивают жизнеспособность сперматозоидов, а также защиту от активных форм кислорода. Исследования селенопротеинов на генном уровне показали, что их отсутствие во время сперматогенеза приводит к аномальному развитию сперматозоидов, что, в свою очередь, влияет на качество спермы [72].

Метаболизм Se хорошо изучен [186]. Главным образом Se влияет на репродуктивные параметры и плодовитость животных. Se выполняет роль катализатора ряда ферментативных реакций, участвует в регуляции окислительно-восстановительных процессов при восстановлении гидроперекисей, так как усиление перекисного окисления липидов приводит к нарушению клеточного метаболизма. Se является стабилизатором плазматических, ядерных и внутриклеточных мембран, обладает антиокислительными свойствами и в некоторых биохимических реакциях

заменяет витамин E. Данные о роли Se в метаболизме мидий, к сожалению, отсутствуют.

Существуют доказательства того, что размер моллюсков может играть роль в поглощении Se. Обнаружено, что концентрация Se в моллюсках *Corbula amurensis*, подвергшихся лабораторному воздействию растворенных источников Se (IV), снизилась на 50%, когда средняя длина раковины моллюсков увеличилась на 30% [168].

Содержание Se в гонадах самок и сперматозоидах коричневых мидий в два раза выше, чем в черных моллюсках, а в яйцеклетках и трохофорах — наоборот. Можно предположить, что отличия в содержании Se и Zn в мягких тканях и половых продуктах черных и коричневыхцветовых морф мидий влияют на биохимический состав как самих моллюсков, так и их половых продуктов и личинок. В целом большие количества многих элементов накапливаются в гонадах самок мидий, что согласуется с измерениями в мягких тканях в преднерестовый период. Это показывает, что элементы биохимически вовлекаются в оогенез мидий. Несмотря на то, что на данный момент не известна никакая специфическая функция этих элементов в репродуктивной системе самок мидий, имеются сообщения об эссенциальности Zn в развитии ооцитов и эмбрионов [153].

В моллюсках и личинках черной морфы содержание Zn больше, чем в коричневых мидиях. В одной из работ [81] была изучена взаимосвязь между концентрациями ( $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$  ткани) и содержанием ( $\text{мкг} \cdot \text{орган}^{-1}$ ) металлов Fe, Zn, Cu, Mn и Cd с сезонными изменениями массы гепатопанкреаса морского гребешка. В результате установлена положительная корреляция между сезонными изменениями концентраций Fe, Zn, Cu и Mn и массой гепатопанкреаса. Максимальную концентрацию микроэлементов в гонадах мидии можно наблюдать на преднерестовой стадии репродуктивного цикла, когда масса гонад максимальна [37].

Концентрация меди, железа, Se и Zn в гонадах, половых продуктах и личинках уменьшалось в следующем порядке: Cu > Fe > Zn > Se (табл. 5.2). Содержание магния, кальция, калия и фосфора выше в гонадах самцов. В гонадах самцов и самок коричневых мидий Mg и Ca, выше, чем у черных. В гонадах самок коричневых и черных мидий, в отличие от самцов, преобладает медь, железо и мышьяк, но в гонадах коричневых мидий содержание этих элементов ниже, чем в черных. Наиболее важным фактором снижения концентрации элементов в тканях является перераспределение элементов по всему организму в процессе интенсивного роста гонад и выведение с половыми продуктами.

Макро- и микроэлементы входят в состав биологически активных веществ: аминокислот, ферментов, витаминов, гормонов, пигментов. Недостаток даже одного из эссенциальных элементов в организме может остановить его рост или репродукцию [187, 188]. Установлена связь концентраций макроэлементов, состоящих из биогенных элементов (C, N, P, S) и основных катионов (Na, Mg, K, Ca), с биоаккумуляцией микроэлементов (Al, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Ba, Pb) в мягких тканях мидии *M. edulis* и *Perna viridis* [176].

Известно, что в черноморской популяции мидии наблюдается полиморфизм по цвету раковины, обусловленный генетически [161, 162]. Установлено, что скорость роста мидий, а также характер связанных с ней метаболических процессов, отличаются у разных фенотипов этих моллюсков [80]. У мидий с разной окраской раковин, обитающих в различных биотопах, обнаружены различия в наследовании цвета раковины и физиологических особенностях. Генетически обусловленные различия в окраске у моллюсков нередко сопряжены с существенными различиями в других сферах жизнедеятельности, в частности, со скоростью роста и процессами дыхания [3]. Коричневые мидии более жизнеспособны в иловых биотопах, черно-фиолетовые лучше выживают в прибойной зоне и наиболее приемлемы для выращивания в марихозьях.

Таким образом, биологические факторы, включающие в себя возраст, размер, пол, генотип, фенотип, активность питания и степень репродуктивного цикла [88, 190, 212, 213, 216] влияют на накопление макро- и микроэлементов. Элементы, не участвующие в метаболических превращениях, выводятся из организма моллюсков с фекалиями, мочой [248] и половыми продуктами [16].

## 5.2 Экскреция элементов вместе с половыми продуктами мидий

Химический состав морских организмов, их многообразные свойства, способность поддерживать жизнедеятельность формируются с участием всех компонентов среды обитания, в том числе микроэлементов. Во взаимоотношении «мидийная ферма – среда» важную роль играют биотические потоки вещества и энергии в условной системе: «вещество → гонады → половые продукты (сперма и яйцеклетки)». Оценить потоки вещества через эти компоненты позволяет балансировый подход.

Наиболее подробно изучен энергетический баланс поселений черноморских мидий в естественных популяциях [60]. Для морских ферм подобный подход реализован при изучении потока каротиноидов в системе «среда → мидия *M. galloprovincialis* → биоотложения мидий» на основе определения качественного и количественного состава каротиноидов в различных органах мидии в зависимости от сезона года и оценки усвояемости пигментов моллюском [43].

Проблема взаимодействия «вода → живое существо» рассматривалась ещё академиком В. И. Вернадским, который выделил концентрационную функцию живого как процесс избирательного извлечения живыми организмами определенных химических элементов из окружающей среды [9]. Извлечение металлов мидиями из морской воды и пищи — процесс динамический. Параллельно с аккумуляцией элементы экскретируются из организма.

При рассмотрении процессов, связанных с нерестом мидий, из всех существующих микроэлементов, которые способны накапливать и экскретировать мидии, следует выделить Se и Zn, необходимые для поддержания функций репродуктивной системы [177]. Концентрации Se в гонадах и половых продуктах самок и самцов мидий изменяются аналогично концентрациям стероидных гормонов [195] и зависят от репродуктивного цикла моллюсков [125]. Анализ содержания Se и Zn в гонадах мидии на разных стадиях репродуктивного цикла, а также в яйцеклетках и сперматозоидах представлен в таблице (табл. 5.3). Концентрация Se в гонадах самцов положительно коррелирует с концентрацией тестостерона. Коэффициент корреляции по Пирсону составил 0,89 ( $p = 0,045$ ).

Как показано в табл. 5.3 и на рис. 5.2, концентрации Se в гонадах и половых продуктах самок и самцов мидий зависят от репродуктивного цикла моллюсков. Максимальная концентрация Se отмечена в половых продуктах: в яйцеклетках —  $14,7 \pm 2,9$  мкг·г<sup>-1</sup>сух.; и в сперматозоидах —  $14,4 \pm 1,8$  мкг·г<sup>-1</sup>сух. Снижение концентрации Se в гонадах мидии после нереста объясняется началом фазы посленерестовой перестройки.

Таблица 5.3 — Концентрация Se и Zn в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах мидии *Mytilus galloprovincialis*

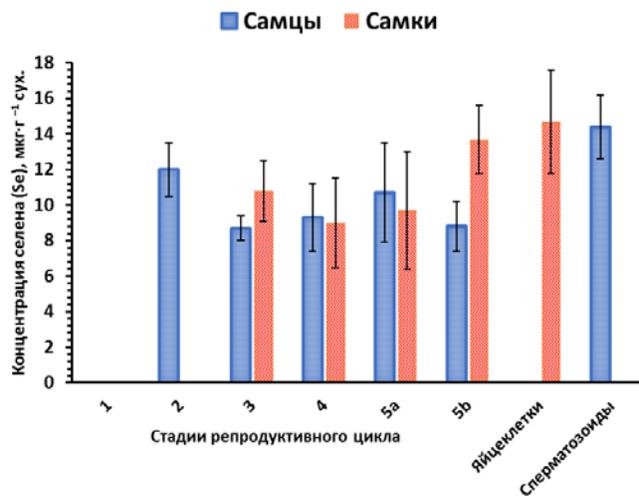
Стадии репродуктивного цикла, ПП	Концентрация элементов, мкг·г <sup>-1</sup> сух.			
	Se		Zn	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
1	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
2	$12,0 \pm 1,5$	н. д.	$33,3 \pm 6,6$	н. д.
3	$8,7 \pm 0,7$	$10,8 \pm 1,7$	$24,6 \pm 3,6$	$35,6 \pm 11,8$
4	$9,3 \pm 1,9$	$9,0 \pm 2,5$	$16,3 \pm 1,9$	$4,5 \pm 31,2$
5a	$10,7 \pm 2,8$	$9,7 \pm 3,3$	$22,9 \pm 5,7$	$56,3 \pm 17,9$
5b	$8,8 \pm 1,4$	$13,7 \pm 1,9$	$27,5 \pm 3,7$	$53,6 \pm 10,9$

## Продолжение таблицы 5.3

Стадии репродуктивного цикла, ПП	Концентрация элементов, мкг·г <sup>-1</sup> сух.			
	Se		Zn	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
Яйцеклетки	н. п.	14,7 ± 2,9	н. п.	49,3 ± 8,2
Сперматозоиды	14,4 ± 1,8	н. п.	19,3 ± 6,4	н. п.

Примечание: н. д. — нет данных; н. п. — не применимо; 5a и 5b — гонады до и после нереста; ПП — половые продукты.

А



Б

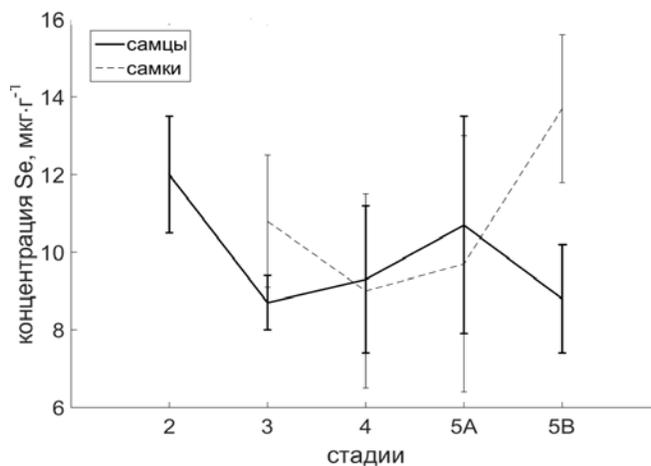
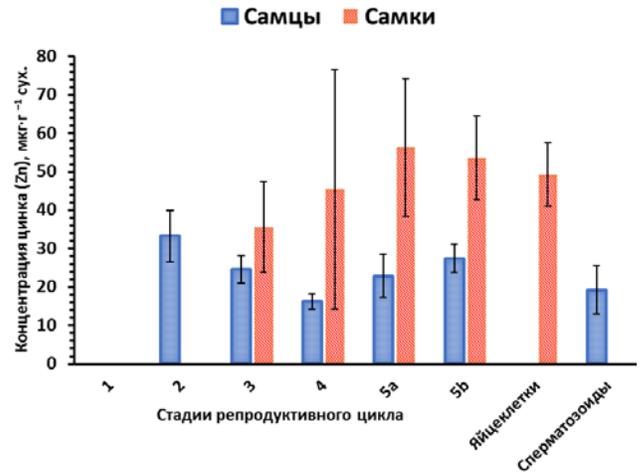


Рисунок 5.2 — Концентрация Se (А) и Zn (Б) в гонадах мидии *Mytilus galloprovincialis*: 5a и 5b — гонады до и после нереста

Согласно приведенным данным, микроэлементы экскретируются моллюсками в водную среду вместе с половыми продуктами. В весенний период во время массового нереста Se полностью переходит в половые продукты. Вероятно, мидии получают из морской среды больше Se, чем необходимо, поэтому процессы экскреции связаны с энергетическими тратами организма, а процессы аккумуляции не связаны, так как концентрации Se и Zn на первой стадии репродуктивного цикла и после нереста максимальны. Zn экскретируется частично. На этот процесс, по-видимому, влияет температура морской воды [9].

Массовый нерест мидий в Чёрном море повторяется два раза в год: весной и осенью [65]. Максимальное количество нерестящихся мидий отмечено в середине апреля. Начало осеннего массового нереста начинался в сентябре — октябре и продолжается в ноябре — декабре. Для мидий в юго-восточной части крымского побережья Чёрного моря пик нереста мидий отмечен в декабре — январе; менее значительный — в мае — июне. Максимальное число самцов нерестится в июле, соотношение самок и самцов в выборке составляет 25 : 75 [37]. Сезонная средняя продолжительность массового нереста достигает 4 месяца в год. Это значит, что мидии экскретируют микроэлементы вместе с половыми продуктами 4 раза в год.

Количество Se и Zn, экскретируемых культивируемыми мидиями во время нереста представлено в табл. 5.4. Одна тонна моллюсков во время нереста способна выделять в окружающую среду вместе со спермой 14,4 г Zn и 19,3 г Se. С яйцеклетками мидий экскретируются 14,7 г Se и 49,3 г Zn.

Таблица 5.4 — Содержание Se и Zn в одной тонне мидии *Mytilus galloprovincialis*

Стадии репродуктивного цикла, ПП	Содержание металлов			
	Se, г·г <sup>-1</sup> <sub>сух.</sub>		Zn, г·г <sup>-1</sup> <sub>сух.</sub>	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
5a	10,7 ± 2,8	9,7 ± 3,3	22,9 ± 5,7	56,3 ± 17,9
5b	8,8 ± 1,4	13,7 ± 1,9	27,5 ± 3,7	53,6 ± 10,9

Продолжение таблицы 5.4

Стадии репродуктивного цикла, ПП	Содержание металлов			
	Se, г·г <sup>-1</sup> <sub>сух.</sub>		Zn, г·г <sup>-1</sup> <sub>сух.</sub>	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
Яйцеклетки	н. п.	14,7 ± 2,9	н. п.	49,3 ± 8,2
Сперматозоиды	14,4 ± 1,8	н. п.	19,3 ± 6,4	н. п.

Примечание: н. п. — не применимо; 5a и 5b — гонады до и после нереста; ПП — половые продукты.

При рассмотрении бионакопления микроэлементов в мидиях необходимо иметь в виду, что большое количество микроэлементов — не менее 30% — поглощается с пищей, но в случае Se эта доля составляет 98% [251, 252].

Неорганический Se может попадать в морскую воду в виде селенита (Se<sup>4+</sup>) или селената (Se<sup>6+</sup>). Мидии накапливают селенит (Se<sup>4+</sup>) в большей мере, чем селенат (Se<sup>6+</sup>). Наиболее вероятно, что разница вызвана химической, а не физической формой элемента, так как наиболее вероятная форма Se в морской воде — Se<sup>4+</sup>. Удельное весовое поглощение Se выше в мягких тканях, чем в раковинах. При этом коэффициент накопления Se мидиями зависит от размера животных. Чем больше сырая масса мидий, тем меньше коэффициент накопления [9]. В природных условиях мидии способны профильтровывать природное взвешенное вещество и пищу быстрее, чем, например, содержащиеся в лаборатории, поэтому в море экскреция элементов должна проходить быстрее, чем в лабораторных условиях.

Zn, полученный из пищи, связан, в основном, с мягкими тканями мидий, а Zn из морской воды — с раковинами [120]. Адсорбция на поверхности, вероятно, является первым этапом накопления всех металлов. Следующий этап — диффузия ионов химических элементов через клеточные мембраны. На процессы диффузии может оказывать влияние клеточный метаболизм. Связывание и депонирование

элемента (или его определенной формы) способствует сохранению концентрационного градиента в системе «среда → клетка» [9].

Показательны результаты определения степени усвоения гидробионтами Se и Zn из пищи с применением математической модели, где в качестве базового использовали следующее уравнение [40]:

$$\frac{dC_r}{dt} = R(C_n q - C_r q_n) - C_r p,$$

где  $C_r$  и  $C_n$  — концентрация химического элемента в гидробионте и его пище,  $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ ;  $p$  — показатель скорости обмена элемента гидробионтом,  $\text{сут}^{-1}$ ;  $R$  — относительный рацион,  $\text{сут}^{-1}$ ;  $q_n$  — степень усвоения пищи для роста ( $K_2$ );  $q$  — степень усвоения элемента из пищи.

Это уравнение, описывающее кинетику обмена микроэлементов в гидробионтах при пищевом поглощении элементов, может быть применено для мидии, если измерено содержание микроэлементов в гонадах моллюсков и половых продуктах с учётом известного коэффициента  $K_2$ . Степень усвоения микроэлементов из пищи оценивается коэффициентом  $q$ , который может являться важной характеристикой, определяющей потребность морских организмов в рассматриваемых нами микроэлементах.

Проведя преобразование данного уравнения [44], получена формула расчёта для оценки степени усвоения Se (Zn) по данным измерений концентраций элементов в тканях мидии и половых продуктах:

$$q = \frac{C_r q_n}{C_r q_n + C_n (1 - q_n)},$$

где  $C_r$  — концентрация химического элемента в гонадах,  $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух.}}$ ;  $C_n$  — его концентрация в сперматозоидах и/или яйцеклетках мидии,  $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух.}}$ ;  $q_n$  — степень усвоения пищи для роста ( $K_2$ );  $q$  — степень усвоения элемента из пищи.

Следует отметить, что в данном подходе не учитывали доли Se и Zn, которые могут экскретироваться вместе с биоотложениями или иным путем. Так, Se в

природе может встречаться в различных аминокислотах. Se, включенный в протеины, может быть выведен мидиями в той же химической форме. Тот факт, что накопление Se во многом связано с раковиной, показывает, что в поглощение и связывание Se включены неметаболические сорбционные процессы, и может происходить экскреция ионов сорбционного Se [9].

Исследование кинетики содержания микроэлементов в мидии *M. galloprovincialis* показало, что концентрация и обмен химического микроэлемента в мидиях может рассматриваться как интегральный процесс во всём их онтогенезе [40], и для оценки усвояемости элементов моллюсками можно использовать среднегодовое значение степени усвоения пищи на рост  $q_{\text{п}}$  ( $K_2$ ), принадлежащее диапазону значений от 0,14 до 0,42 [60]. Значение степени усвоения Se и Zn из пищи мидией *M. galloprovincialis* приведено в табл. 5.5.

Таблица 5.5 — Степень усвоения Se и Zn из пищи ( $q$ ) мидией *Mytilus galloprovincialis*

Стадии репродуктивного цикла	$q$ Se ( $q_{\text{п}} = 0,14$ )		$q$ Zn ( $q_{\text{п}} = 0,14$ )	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
1	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
2	$0,12 \pm 0,03$	н. д.	$0,22 \pm 0,08$	н. д.
3	$0,09 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
4	$0,10 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,02$
5a	$0,11 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
5b	$0,09 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
Стадии репродуктивного цикла	$q$ Se ( $q_{\text{п}} = 0,42$ )		$q$ Zn ( $q_{\text{п}} = 0,42$ )	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
1	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
2	$0,38 \pm 0,09$	н. д.	$0,55 \pm 0,07$	н. д.
3	$0,30 \pm 0,06$	$0,35 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,03$

Продолжение таблицы 5.5

Стадии репродуктивного цикла	$q \text{ Se } (q_{\text{п}} = 0,42)$		$q \text{ Zn } (q_{\text{п}} = 0,42)$	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
4	$0,32 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,08$	$0,40 \pm 0,06$
5a	$0,35 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,03$
5b	$0,31 \pm 0,11$	$0,40 \pm 0,20$	$0,51 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,20$

Примечание: н. д. — нет данных; 5a и 5b — гонады до и после нереста.

В гонадах мидии *M. galloprovincialis* в весенний период рассчитанные значения  $q$  для Se колеблются в диапазоне от 0,1 до 0,4, что ниже среднегодовых значений степени усвоения пищи на рост  $q_{\text{п}}$  ( $K_2$ ), равных 0,14 и 0,42 [60]. Рассчитанные значения  $q$  для Zn — от 0,1 до 0,6, что выше среднегодовых значений степени усвоения пищи на рост  $q_{\text{п}}$  ( $K_2$ ), равных 0,14 и 0,42.

Известно, что если эффективность усвоения микроэлементов из пищи ниже среднегодовых значений степени усвоения пищи на рост, передача вещества по трофической цепи будет идти с понижением темпа загрязнения последующего звена [40]. Поэтому можно утверждать, что Se и Zn экскретируются с разной интенсивностью.

При известных значениях степени усвоения элемента из пищи ( $q$ ) и степени усвоения пищи на рост ( $q_{\text{п}}$ ) можно определить предельный коэффициент пищевого накопления микроэлемента по уравнению:  $K_{\text{п}} = Rq / (Rq_{\text{п}} + p)$  [40], откуда (при  $p = 0$ , где  $p$  — показатель скорости обмена элемента гидробионтом, сут<sup>-1</sup>;  $R$  — относительный рацион),  $K_{\text{п}} = q / q_{\text{п}}$ , то есть отношению степени усвоения Se или Zn из пищи к среднегодовому значению степени усвоения пищи на рост  $q_{\text{п}}$  ( $K_2$ ) (табл. 5.6).

Таблица 5.6 — Максимальный коэффициент пищевого накопления микроэлемента ( $K_{\text{п}}$ ) мидией *Mytilus galloprovincialis*

Стадии репродуктивного цикла	$K_{\text{п}} \text{ Se } (q_{\text{п}} = 0,14)$		$K_{\text{п}} \text{ Zn } (q_{\text{п}} = 0,14)$	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
1	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
2	$0,86 \pm 0,21$	н. д.	$1,57 \pm 0,59$	н. д.
3	$0,64 \pm 0,23$	$0,79 \pm 0,52$	$1,21 \pm 0,07$	$0,79 \pm 0,07$
4	$0,71 \pm 0,31$	$0,64 \pm 0,53$	$0,86 \pm 0,35$	$0,93 \pm 0,12$
5a	$0,79 \pm 0,42$	$0,71 \pm 0,62$	$1,14 \pm 0,07$	$1,14 \pm 0,07$
5b	$0,64 \pm 0,74$	$0,93 \pm 0,61$	$1,36 \pm 0,07$	$1,07 \pm 0,07$
Стадии репродуктивного цикла	$K_{\text{п}} \text{ Se } (q_{\text{п}} = 0,42)$		$K_{\text{п}} \text{ Zn } (q_{\text{п}} = 0,42)$	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
1	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
2	$0,90 \pm 0,20$	н. д.	$1,31 \pm 0,2$	н. д.
3	$0,71 \pm 0,12$	$0,83 \pm 0,05$	$1,14 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,07$
4	$0,76 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,23$	$0,95 \pm 0,14$
5a	$0,83 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,07$
5b	$0,74 \pm 0,23$	$0,95 \pm 0,54$	$1,21 \pm 0,22$	$1,05 \pm 0,54$

Примечание: н. д. — нет данных; 5a и 5b — гонады до и после нереста.

Значения  $K_{\text{п}}$  для Se и Zn в гонадах мидий в весенний период составляют от 0,64 до 1,36, что выше степени усвоения и вовлечения в биохимические процессы ( $q$ ) рассматриваемых микроэлементов. Этот факт еще раз подтверждает экскрецию Se и Zn из организма мидий.

**Заключение по 5 главе.** При оценке содержания металлов в тканях мидий следует учитывать пол моллюсков, их возраст и репродуктивный цикл, который оказывает влияние на межсезонные изменения массы ткани. В гонадах самцов и самок черных и коричневых цветовых морф мидий не наблюдали достоверного

отличия в макроэлементном составе, тогда как в половых продуктах и личинках отличия были существенные. В гонадах, половых продуктах коричневых мидий содержание углерода и, следовательно, содержание органических соединений выше, чем в черных мидиях.

В яйцеклетках коричневой морфы кислорода в два раза меньше, а в трохофорах на порядок больше, чем в моллюсках, относящихся к черной морфе. Это показывает, что в трохофорах коричневых мидий содержится большое количество полисахаридов и/или других энергетических доноров и гликогена. Десятикратное превышение азота в сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий, по сравнению с черными, в основном указывает на различный аминокислотный состав моллюсков, что может быть связано как с условиями их обитания, так и заложено генетически. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий фосфора, и соответственно АТФ, больше, чем в черных моллюсках. В яйцеклетках наоборот.

В сперматозоидах черных мидий серы и серосодержащих аминокислот в несколько раз больше, чем у коричневых. Содержание Se и Zn в моллюсках черной морфы больше, чем в коричневых мидиях, из-за сниженной ферментативной активности, по сравнению с коричневой морфой. В гонадах самцов и самок коричневых мидий концентрация марганца, кальция, калия и фосфора выше, чем у черных. В гонадах самок мидий преобладает медь, железо и мышьяк, но в гонадах коричневых мидий содержание этих элементов ниже, чем в черных. Больше всего статистически значимых отличий отмечено в трохофорах и яйцеклетках черных и коричневых цветковых морф мидий. Это показывает, что мидии двух морф развиваются с разной интенсивностью, что приводит к очевидным отличиям биохимического состава моллюсков. Вероятно, в процессе биохимической эволюции в организмах возникали разнообразные металлопротеины, и эта диверсификация требовала не только химической вариабельности элементов, но и их относительно высоких концентраций в тканях.

На примере селена и цинка впервые удалось доказать взаимосвязь элементного состава гонад на разных стадиях репродуктивного цикла с тестостероном. Этот факт еще раз подтверждает предположение о том, что стероиды, жирные кислоты и микроэлементы попадают в организм мидий извне, а затем задействуются в биохимических превращениях, что особенно наглядно показано во время репродуктивного цикла.

Следует отметить, что расчеты количества элементов, также как и стероидных гормонов, экскретируемых мидиями во время нереста, демонстрируют лишь то, что они имеют значительные величины и, вероятно, играют существенную роль в экологическом метаболизме моря. Во время нереста элементный и гормональный состав мидий не постоянен, так как зависит от ряда факторов: питания, сезонности, температуры, состояния гонад, условий роста мидий и др.

## **ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ГОНАД И ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS***

Морских моллюсков можно рассматривать в качестве природного ресурса, используемого для получения новых натуральных продуктов различного назначения [82]. Молекулярное разнообразие химических соединений, являющееся результатом их уникальных физиологических и биохимических адаптаций, открывает широкие возможности для открытия и выделения из липидной фракции природных соединений с разнообразной биологической активностью [111].

Мидии представляют собой источник физиологически активных веществ различной природы: тестостерона и эстрадиола [195], эйкозапентаеновой (20: 5 $\omega$ 3) и докозагексаеновой (22: 6 $\omega$ 3) ПНЖК, известных своим благотворным влиянием на здоровье человека [4, 155], а также являются источником эмбриональных стволовых клеток [154], обладающих свойствами мультипотентности и плюрипотентности [231].

Эмбриональные тотипотентные клетки моллюсков способны направленно изменять свои функции и свойства в зависимости от сигналов из окружающей среды, т. е. обладают эффектом Хоуминга. Последнее заставляет клетки дифференцироваться в клетки соответствующей ткани [14]. Кроме этого, эмбриональные стволовые клетки моллюсков обладают свойством тотипотентности [257]. В культурах клеток двустворчатых моллюсков сигнал к делению воспринимают только малодифференцированные клетки, т. е. клетки ранних стадий эмбрионального развития. В тканях морских беспозвоночных обнаружены вещества, подобные эпидермальному фактору роста млекопитающих. Эти вещества обладают значительным митогенным потенциалом, стимулируя синтез ДНК в клетках позвоночных и беспозвоночных животных [36].

Мидия *M. galloprovincialis* является ценным объектом аквакультуры, характеризуется массовостью и доступностью, а также широко используется в научных исследованиях. Поэтому на основе изучения физиологически активных веществ липидной природы в мидии нами разработаны и запатентованы четыре технологии выделения, очистки и применения этих соединений: 1. Способ получения биологически активного вещества из черноморской мидии. 2. Способ получения функционального продукта из мидии. 3. Способ получения масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами из мидии. 4. Способ получения вещества из гонад мидий, обладающего противоопухолевой активностью. Кроме того, разработан метод выделения эмбриональных тотипотентных стволовых клеток из оплодотворенных яйцеклеток мидии.

### **6.1 Способ получения биологически активных веществ и эмбриональных тотипотентных клеток из гонад и половых продуктов мидий**

Гонады и половые продукты мидии являются перспективными источниками получения пищевых БАД или лекарственных препаратов — стимуляторов либидо [195]. Мидии далеко отстоят от человека по эволюционной лестнице, поэтому при извлечении из липидной фракции стероидов или жирных кислот практически отсутствует вероятность передачи человеку перекрестных (например, вирусных) болезней.

С возрастом в человеческом организме происходит заметное снижение содержания некоторых гормонов, в частности, тестостерона. Кроме того, замедляются биохимические процессы, позволяющие сдерживать баланс между свободными активными формами тестостерона и его неактивными эфирами.

Снижение содержания тестостерона в крови мужчин приводит к снижению влечения и угнетению половой функции.

В экспериментах, выполненных на крысах-самцах, установлено, что нативные и лиофильно высушенные гонады морских ежей оказывают стимулирующее действие на половое поведение. Доказана связь половой активности с влиянием компонентов гонад на андрорецепторы репродуктивной системы животных [58, 69].

Например, икру морских ежей также используют как компонент для приготовления водно-спиртовых настоек из сырья растительного и животного происхождения. Примером может послужить «Композиция ингредиентов для горькой настойки-бальзама» [20]. Способ переработки икры морских ежей [57, 58] включает заготовку сырья, последовательную обработку его двумя экстрагентами и фильтрование. При этом сначала икру обрабатывают 95% этиловым спиртом, настаивают, осадок отфильтровывают. Твердый остаток икры сушат и измельчают. Изобретение позволяет наиболее полно произвести экстракцию БАВ из сырья и использовать твердый остаток в качестве корма для животных. Недостатком вышеупомянутых изобретений является то, что в качестве гормоносодержащего сырья применяют лишь икру гидробионтов, не принимая во внимание то, что сперма этих животных может обладать более мощным андрогенным эффектом.

Нами также разработан способ получения биологически активного вещества из мидии *Mytilus galloprovincialis* [56]. Этот способ реализуется с целью создания технологии переработки гонад и/или половых продуктов мидии и извлечения продукта с высоким содержанием тестостерона. Целесообразность использования половых продуктов мидий в качестве исходного сырья для получения средства, поддерживающего общий физиологический статус и репродуктивную активность человека, подтвердили результаты иммуноферментного анализа [195]. Гонады и половые продукты мидий можно также использовать как средство в качестве добавки к регенерирующей косметике или к пище.

Содержание тестостерона в гонадах и половых продуктах мидий не является величиной постоянной [16, 86, 195], поэтому этот параметр требует применения физико-химических методов исследований на этапе определения концентраций гормонов в целевом продукте. Предварительные исследования методом иммуноферментного анализа, проводимые на мидиях, позволяют оценить концентрацию половых гормонов в готовом продукте (таблица 6.1).

Таблица 6.1 — Содержание стероидных гормонов в гонадах перед нерестом и половых продуктах мидии *Mytilus galloprovincialis*

Нерестовая стадия зрелости гонад, ПП	Концентрация стероидных гормонов, $\text{пг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух.}}$			
	Общий тестостерон		Эстрадиол	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
5	$975,1 \pm 464,3$	$859,0 \pm 116,1$	$132,2 \pm 34,3$	$529,0 \pm 26,1$
Яйцеклетки	н. п.	$10,1 \pm 4,8$	н. п.	$539,5 \pm 122,8$
Сперматозоиды	$14284,8 \pm 259,2$	н. п.	$194,4 \pm 59,2$	н. п.

Примечание: н. п. — не применимо; ПП — половые продукты.

В способе получения из мидии *M. galloprovincialis* препарата, стимулирующего половое поведение, применяют гонады, собранные во время массового нереста, и/или половые продукты, которые последовательно обрабатывают 95% этанолом, настаивают в течение суток при комнатной температуре, а затем отфильтровывают.

Приведем три примера получения препарата.

Пример 1. Замороженные или свежесобранные гонады мидии заливали 95% этиловым спиртом в соотношении 1 : 5 (исходное сырье : спирт), настаивали в течение суток при комнатной температуре, затем отделяли полученный экстракт. Гонады вновь заливали 95% этиловым спиртом в соотношении 1 : 5 (сырье : спирт), настаивали в течение суток при комнатной температуре и отделяли полученный

экстракт. Оба экстракта объединяли, отстаивали при комнатной температуре в течение суток до получения прозрачного раствора, который затем отфильтровывали. Концентрация общего тестостерона в полученном продукте составила  $569,8 \text{ пг} \cdot \text{г}^{-1}$  сух. в пересчете на 1 г сухой массы гонад.

Пример 2. Замороженные или свежесобранные сперматозоиды мидии заливали 95% этиловым спиртом в соотношении 1 : 5 (исходное сырье : спирт), настаивали в течение суток при комнатной температуре, экстракт сливали. Сперматозоиды вновь заливали 95% этиловым спиртом в соотношении 1 : 5 (сырье : спирт), настаивали в течение суток при комнатной температуре и снова отделяли экстракт. Экстракты объединяли, отстаивали при комнатной температуре в течение суток до получения прозрачного раствора, который затем отфильтровывали. Концентрация общего тестостерона в полученном продукте составила  $14306,32 \text{ пг} \cdot \text{г}^{-1}$  сух. в пересчете на 1 г лиофилизированных половых продуктов.

Пример 3. В качестве исходного сырья использовали яйцеклетки мидий. Конечный продукт получали аналогично примерам 1 и 2. Концентрация тестостерона в готовом продукте составила  $10 \text{ пг} \cdot \text{г}^{-1}$  сух.

Кроме гормоносодержащего сырья, мидия *M. galloprovincialis* является ценным источником тотипотентных (стволовых) клеток. Биология стволовых клеток морских беспозвоночных имеет первостепенное значение для научных исследований. Моллюски успешно заменяют млекопитающих или других позвоночных в биологических исследованиях, а также с их помощью можно объяснить биологических явлений, которые не встречаются у позвоночных, например, регенерация всего тела, скрытое или запрограммированное старение и т. д. [78].

Эмбриональные клетки, получаемые на доличиночных стадиях развития моллюсков, могут быть объектом изучения процессов, регулирующих морфогенетические функции ядер, что недоступно для изучения на клетках

человеческих эмбрионов. Однотипность эмбрионального развития животных различного филогенетического уровня предполагает перспективность поиска аналогичных структур и источников БАВ у мидий, что служит сырьем для получения лечебно-профилактических и косметических препаратов.

Размножение мидии *M. galloprovincialis* в лабораторных условиях хорошо изучено [65]. Это дает возможность в контролируемых условиях получать стволовые клетки в массовом количестве. При слиянии сперматозоида с яйцеклеткой образуется зигота, которая начинает делиться, не увеличиваясь в размерах, т.е. дробиться, образуя клетки-бластомеры (зигота и образованные ей бластомеры 2–8 клеточной стадии). На рисунке 6.1 показаны первые в организме стволовые клетки, способные делиться неопределенное число раз и превращаться (специализироваться) в клетки тканей. Такая особенность стволовых клеток связана с наличием фермента теломеразы. В соматических клетках такой фермент неактивен или отсутствует и, следовательно, клетка запрограммирована на определенное число делений. В конечном итоге клетка теряет жизненно важные гены и погибает. В стволовых клетках еще не экспрессированы белки гистосовместимости, поэтому при трансплантации они не вызывают иммунной реакции отторжения [231].



Рисунок 6.1 — Стадии дробления эмбрионального периода: зигота делится на две, четыре и восемь клеток [65]

В современной медицине нет более спорной темы, чем применение стволовых клеток, так как забор эмбриональных и фетальных стволовых представляет большую этическую проблему. Именно поэтому в качестве источника стволовых клеток могут выступать клетки и ткани моллюсков. Наиболее известными являются способы получения стволовых клеток из трохофор устриц [92] и мантийной ткани моллюсков [110].

Тотипотентные стволовые клетки могут применять не только в клеточной терапии и при выращивании органов для трансплантации, но и содержат ростовые факторы, антиоксиданты, противовоспалительные соединения и БАВ [4, 195], которые на некоторое время сохраняют свои свойства в 96% этиловом спирте. Физиологическую активность клеток в спиртовом растворе можно оценить по уровню синтеза РНК [197].

Жизнеспособные эмбриональные клетки мидий потенциально могут стать культурами-продуцентами сложных БАВ, но вопрос о длительном хранении бластомеров ещё открыт. Даже через 7–10 дней при различных способах хранения доля жизнеспособных клеток снижения до 60%, что не позволяет использовать эмбриональные стволовые клетки без постоянного лабораторного контроля, так как известно, что наибольшей ДНК-синтетической активностью обладают клетки на ранних стадиях дробления [245].

Способ получения стволовых клеток из мидий достаточно прост и включает этапы: температурную стимуляцию нереста; получение половых продуктов; оплодотворенных яйцеклеток и эмбриональных стволовых клеток; отбор эмбриональных стволовых клеток на стадии образования бластомеров не позднее, чем через час после оплодотворения; разделение бластомеров при помощи раствора лимоннокислого натрия; фильтрование или осаждение стволовых клеток.

Наиболее близким к заявленному изобретению является «Способ получения эмбриональных стволовых клеток из объектов марикультуры, например, мидии

*Mytilus galloprovincialis* и черноморской камбалы-калкан *Scophthalmus maeoticus*», предложенный В. Н. Ивановым [55]. Способ позволяет получать и экспериментировать с диплоидными клетками после мейоза I, гаметами и зародышами на различных стадиях развития и морфогенеза, но не предполагает способов применения и хранения стволовых клеток. Недифференцированные тотипотентные стволовые клетки могут стать источником тестостерона и аминокислот, представляющих интерес для фармакологической промышленности. Продукция таких веществ *in vitro* может стать альтернативой химическому синтезу.

Для усовершенствования известной технологии мы предлагаем:

Пример 1. Моллюсков с длиной раковин 50–60 мм собирали с коллекторов фермы в период нереста с глубины 2–3 м. После механической очистки раковин мидии рассаживали по 1 экз. в стаканы объемом 0,5 л и заливали профильтрованной морской водой, нагретой до 23–25 °С.

Яйцеклетки в процессе нереста оседали на дно в виде оранжевого осадка. Сперма образовывала в воде мутное белое облако. Зрелость яйцеклеток определяли с помощью микроскопа по отсутствию ядер. Количество яйцеклеток подсчитывали с помощью бинокля «МБС-9» в камере Богорова. Концентрацию сперматозоидов подсчитывали после их обездвиживания в парах формалина.

Искусственное оплодотворение проводили из расчета 10 сперматозоидов на 1 яйцеклетку при температуре морской воды 20–22 °С. Для этого из 150 мидий получали примерно 20–30 растворов с яйцеклетками, которые отфильтровывали от биоотложений в сосуд объемом 5 л на газ-сите с диаметром ячеек 40 мкм. Если количество жидкости в сосуде получалось менее 5 л, то доводили до объема профильтрованной морской водой, нагретой до температуры 20–22 °С. Воду из стаканов, содержащую сперму, отфильтровывали от биоотложений в другой сосуд объемом 5 л на газ-сите с диаметром ячеек 40 мкм. Для предотвращения

полиспермии к раствору с яйцеклетками добавляли 10 мл раствора со сперматозоидами.

Оплодотворение происходило очень быстро, поэтому сбор стволовых клеток мидий проводили не позднее, чем через час после оплодотворения, чтобы клетки не успели дифференцироваться. Используя камеру Богорова и бинокляр «МБС-9», подсчитывали количество эмбрионов. В 1 л такого раствора содержалось примерно  $1700 \pm 300$  эмбриональных клеток. На данном этапе проводили разделение бластомеров на отдельные клетки, снижая концентрацию ионов кальция во внеклеточной системе, соединяющей бластомеры. Для этого в морскую воду добавляли лимоннокислый натрий, таким образом, чтоб его концентрация в растворе морской воды составила 0,1 М. Цитрат-ионы (антикоагулянт) при взаимодействии с катионами кальция в нейтральной среде не образуют осадка — раствор остается прозрачным. Эмбриональные стволовые клетки собирали на газ-сите с диаметром ячеек 20 мкм и промывали дистиллированной водой. Полученные клетки заливали 96% этиловым спиртом в соотношении 1 : 2 (исходное сырье : спирт).

Полученная настойка, содержащая стволовые клетки из мидии *M. galloprovincialis*, может быть использована в медицинских и косметических целях.

## 6.2 Способ получения функционального продукта из мидий

Способ создания функционального продукта из мидии включает получение спиртовой настойки стволовых клеток и половых продуктов [52].

Пример 1. Так как половые продукты, следовательно, и стволовые клетки мидии *M. galloprovincialis* содержат БАВ, такие как тестостерон, аминокислоты и ПНЖК, то можно получать суспензию, содержащую эмбриональные стволовые клетки и неоплодотворенные половые продукты, в 96% этиловом спирте в соотношении 1 : 2 (исходное сырье : спирт). При этом получение стволовых клеток

проводят, как в способе 6.1, но через 60 мин после оплодотворения blastomeres не разделяют с помощью лимоннокислого натрия, а осаждают вместе с половыми продуктами при 1500 об/мин. Помутневший осадок отмывают дистиллированной водой путем повторного центрифугирования. Удаляют водный слой, а осадок, содержащий blastomeres и половые продукты, заливают 96% этиловым спиртом в соотношении 1 : 2, соответственно. Полученная спиртовая настойка содержит как стволовые клетки, так и половые продукты, поэтому её физиологическая активность повышается. Настойку можно употреблять внутрь как средство, обладающее физиологической активностью.

### **6.3 Способ получения из мидий масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами**

ПНЖК являются обязательными компонентами многих клеточных структур всех живых организмов, прежде всего клеточных мембран. Пластичность клеточных мембран преимущественно определяется степенью ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав липидов мембран [62]. Функциональная роль ПНЖК заключается в нормализации деятельности всех мембранных структур клеток и внутриклеточной передачи информации. В человеческом организме ПНЖК препятствуют развитию кожных аллергий и сохраняют коллаген-эластичную основу кожи, а также обладают антиоксидантным действием [94, 103].

Омега-3 ЖК замедляют рост и вызывают апоптоз раковых клеток человека, вызванных раком органов желудочно-кишечного тракта, простаты и молочной железы. Омега-3 ЖК действуют синергически с химиотерапевтическими агентами и могут также использоваться для повышения радиочувствительности опухоли. Лежащие в основе противоопухолевых эффектов омега-3 ЖК механизмы основаны на способности омега-3 ЖК включаться в биологические мембраны, изменяя

профиль липидных медиаторов, образующихся при воспалительных реакциях. Кроме того, омега-3 ЖК действуют как эндогенные лиганды ядерных рецепторов, регулируя экспрессию определенных генов, управляя развитием, гомеостазом и метаболизмом организма [256].

Мидия *M. galloprovincialis* из Чёрного моря представляет интерес для получения веществ, обладающих физиологической активностью, особенно в период массового нереста, когда концентрация этих веществ максимальна. В гонадах мидий, культивируемых в Крыму, обнаружены вещества разной природы: биологически активные вещества с высоким содержанием тестостерона [195, 155], биоантиоксидантов и иммуномодуляторов [4, 54]. Проведенные клинические испытания показали, что экстракты из гонад мидий оказывают иммуномодулирующее действие [4, 54] и могут быть использованы в ликвидации последствий воздействия ионизирующего излучения.

У мидии *M. galloprovincialis* наблюдают два пика нереста — осенью и весной, когда содержание ПНЖК в измельченных тканях мидий со средней длиной 48,58 ( $\pm 0,86$ ) ÷ 77,52 ( $\pm 0,86$ ) мм и средней массой 11,01 ( $\pm 0,47$ ) ÷ 42,18 ( $\pm 4,51$ ) г варьирует от 50,67 ( $\pm 0,59$ )% (осенью) до 55,8 ( $\pm 1,29$ )% (весной) [104]. Нами показано, что во время массового нереста мидий содержание ПНЖК в гонадах самок составляет 33,5%, у самцов — 25,3%, а яйцеклетках — 52,4%, а в сперматозоидах — 58,8% [155].

Поскольку содержание ПНЖК в организме моллюсков зависит от многих факторов, в том числе от присутствия органических поллютантов и стероидов в среде выращивания [35, 77], то, как и в случае со стероидными гормонами, сложно предугадать концентрацию ПНЖК в теле моллюсков. Подобные исследования подразумевают наличие искусственно созданных условий выращивания мидий, исключаящее или, наоборот, включающее воздействие органических веществ на

условия среды выращивания, с целью получения относительно стабильного ПНЖК-профиля.

Гонады и половые продукты также служат источником каротиноидов, обладающих множеством физиологических и биологических функций, включая их антиоксидантные и противоопухолевые свойства [4, 87, 235]. Содержание каротиноидов в гонадах самцов и самок мидии *M. galloprovincialis* практически одинаково — 2 мг на 100 г сухой массы гонад; в яйцеклетках — 5 мг на 100 г сухой массы, в сперматозоидах — 0,4 мг на 100 г сухой массы [13]. Витамин Е, входящий в масляные растворы, обладает мощными антиоксидантными свойствами [214].

Известно несколько изобретений, предназначенных для получения масляных растворов, обогащенных физиологически активными веществами. Например, способ обогащения оливкового масла фукоксантином [53], в котором производят смешивание спиртовой вытяжки из бурых водорослей рода *Cystoseira*, содержащей фукоксантин, с дистиллированной водой, оливковым маслом с добавлением поваренной соли. Изобретение позволяет получать обогащенное фукоксантином оливковое масло, пригодное к применению, как в чистом виде, так и в производстве пищевых продуктов и БАВ. Недостатком изобретения является большое количество процедур при реализации способа, в результате чего концентрация фукоксантина в масле значительно снижается по сравнению с его концентрацией в спиртовой вытяжке.

Нами разработан способ получения масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами из мидии *M. galloprovincialis* [51], который предназначен для получения масляного раствора витамина Е, обогащенного эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3), докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3), арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) ПНЖК и каротиноидами. Продукт пригоден для применения в чистом виде в фармацевтике и в производстве косметических и пищевых продуктов.

Задача «Способа получения масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами из мидии *M. galloprovincialis*» заключалась: в расширении ассортимента известных масляных композиций путем насыщения продажного 10% масляного раствора витамина Е ПНЖК и каротиноидами; в максимальном сокращении количества процедур при переходе этих веществ из спиртового экстракта в масляный раствор витамина Е в присутствии воды. Для выделения ПНЖК и каротиноидов достаточно применять или гонады, расположенные у стенок створок, или половые продукты, не используя мясо мидии.

Рассмотрим несколько примеров реализации способа.

Пример 1. Из яйцеклеток мидии *M. galloprovincialis* предварительно получали спиртовой экстракт в соответствии со способом 6.1. К 50 мл спиртового экстракта яйцеклеток, содержащего ПНЖК и каротиноиды, добавляли 50 мл продажного 10% масляного раствора витамина Е. Смесь перемешивали в течение 5 мин с 50 мл дистиллированной воды и отстаивали 30–40 мин в делительной воронке. После смешения спирта с водой и образования несмешивающейся с водой масляной фракции, удаляли водный слой. В результате получали 50 мл не содержащего этилового спирта (или с присутствием микроколичеств этилового спирта) масляного раствора витамина Е, обогащенного каротиноидами, арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6), эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3) и докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) ПНЖК.

Масляный раствор витамина Е объемом 50 мл содержал: 1,9 г ПНЖК (суммарное содержание эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3), докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) и арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) ПНЖК составило 0,4 г) и 0,2 г каротиноидов. Полученный продукт обладал прозрачным цветом с лимонным оттенком, гомогенной консистенцией, вкусом и запахом масла.

Пример 2. Из сперматозоидов мидии *M. galloprovincialis* предварительно получали спиртовой экстракт в соответствии со способом 6.1. К 50 мл спиртового

экстракта сперматозоидов, содержащего ПНЖК и каротиноиды, добавляли 50 мл 10% масляного раствора витамина Е, затем тщательно перемешивали смесь в течение 5 мин с 50 мл дистиллированной воды. Отстаивали 30–40 мин в делительной воронке. После смешения спирта с водой и образования несмешивающейся с водой масляной фракции, удаляли водный слой. В результате получали 50 мл не содержащего спирта (с возможным присутствием микроколичеств этилового спирта) масляного раствора витамина Е, обогащенного каротиноидами, эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3), докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) и арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) ПНЖК.

На выходе получали 50 мл масляного раствора витамина Е, обогащенного эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3), докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3), арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) ЖК массой 0,16 г, с общим содержанием ПНЖК 1,66 г, и каротиноидами массой 0,02 г. Полученный прозрачный с лимонным оттенком продукт обладал гомогенной консистенцией, вкусом и запахом масла.

Пример 3. Из гонад 40 самок мидий, окрашенных в ярко-оранжевый цвет, и находящихся на преднерестовой и нерестовых стадиях репродуктивного цикла, предварительно получали спиртовой экстракт в соответствии со способом 6.1. К 50 мл спиртового экстракта гонад, содержащего ПНЖК и каротиноиды, добавляли 50 мл 10% масляного раствора витамина Е. Смесь тщательно перемешивали в течение 5 мин с 50 мл дистиллированной воды. Отстаивали 30–40 мин в делительной воронке. После смешения спирта с водой и образования несмешивающейся с водой масляной фракции, удаляли водный слой. В результате получали 50 мл не содержащего спирта (с возможным присутствием микроколичеств этилового спирта) масляного раствора витамина Е, обогащенного каротиноидами, эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3), докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) и арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) ПНЖК.

Полученный масляный раствор витамина Е обладал гомогенной консистенцией, прозрачным с лимонным оттенком цветом, вкусом и запахом масла и содержал 1,6 г ПНЖК и 0,08 г каротиноидов.

Пример 4. Из гонад 40 самцов мидий, окрашенных в бледный молочно-белый цвет, и находящихся на преднерестовой и нерестовой стадиях репродуктивного цикла, предварительно получали спиртовой экстракт в соответствии с описанием к способу 6.1. К 50 мл спиртового экстракта гонад, содержащего ПНЖК и каротиноиды, добавляли 50 мл 10% масляного раствора витамина Е. Смесь встряхивали не более 5 мин с 50 мл дистиллированной воды в делительной воронке и отстаивали 30–40 мин. После образования масляной фракции, удаляли водно-спиртовой слой. В результате получали 50 мл не содержащего спирта (с возможным присутствием микроколичеств этилового спирта) масляного раствора витамина Е, обогащенного каротиноидами и эйкозапентаеновой (C20:5 $\omega$ 3), докозагексаеновой (C22:6 $\omega$ 3) и арахидоновой (C20:4 $\omega$ 6) ПНЖК. Содержание ПНЖК в готовом продукте составило 1,53 г, а содержание каротиноидов — 0,08 г. Полученный прозрачный масляный раствор витамина Е обладал лимонным оттенком, гомогенной консистенцией, вкусом и запахом масла.

#### **6.4 Способ получения из гонад мидий вещества, обладающего противоопухолевой активностью**

Из-за снижения популяционной устойчивости населения к болезням проблема получения лечебно-профилактического питания и лечебных препаратов из морских организмов особенно актуальна. Поэтому возникает необходимость к комплексному использованию естественных возможностей борьбы с раковыми заболеваниями. Препараты, полученные из мидии *M. galloprovincialis*, можно использовать для профилактики и лечения злокачественных опухолей [4, 54].

Жиры культивируемых мидий имеют большую биологическую ценность, т. к. содержат около 40% незаменимых для организма человека ПНЖК. Вещества этого класса перспективны как потенциальные противоопухолевые агенты [4, 54].

Например, арахидоновая (C20:4 $\omega$ 6) кислота является предшественником простагландинов [155]. Поскольку содержание ПНЖК в организме моллюсков зависит от многих факторов, в том числе от присутствия органических поллютантов и стероидов в среде выращивания [35, 77], то, как и в случае со стероидными гормонами, сложно предугадать концентрацию ПНЖК в моллюсках. Подобные исследования подразумевают наличие искусственно созданных условий выращивания моллюсков, исключая или, наоборот, провоцирующих воздействие на среду выращивания некоторых факторов, с целью получения относительно стабильного ПНЖК-профиля.

Известен лишь один способ получения вещества, обладающего противоопухолевой активностью, из гонад коллекторной мидии *M. galloprovincialis* путем экстракции смесью хлороформ : спирт [54]. В известном способе из мидий выделяют гонады, находящиеся на 3 и 4 стадиях репродуктивного цикла. Сырые гонады растирают со смесью растворителей хлороформ : этанол (1 : 1); центрифугируют; трижды отмывают водой от нелипидных примесей. Хлороформную фракцию упаривают в вакууме; добавляют гексан и 85% водный этанол; водно-спиртовую фракцию экстрагируют гексаном и упаривают в вакууме. Недостатком известного способа является низкий выход ЖК.

Предложенный нами способ [50], позволяет выделять из гонад мидий ПНЖК в количествах, достаточных для их практического применения (таблица 6.2).

Таблица 6.2 — Содержание ЖК (%) в гонадах мидии *Mytilus galloprovincialis*

Стадии репродуктивного цикла	Масса гонад, г <sub>сух.</sub>		Содержание ЖК (%) в общих липидах					
			НЖК		МНЖК		ПНЖК	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
4	748,6 ± 100	761,5 ± 300	42,5	81,1	35,9	3,7	21,6	15,2
5	718,2 ± 100	730,0 ± 100	100	44,4	н. о.	22,1	н. о.	33,5

Примечание: н. о. — не обнаружено.

В гонадах мидий, находящихся на 4–5 стадиях репродуктивного цикла (перед нерестом), концентрация ПНЖК максимальна.

Примеры реализации способа.

Пример 1. Из 4 кг мидий выделяли 120 г сырых гонад. Гонады гомогенизировали в смеси хлороформ : этанол (1 : 1) при температуре 37 °С в течение 30 мин, затем центрифугировали. Экстракт дважды отмывали водой от нелипидных примесей. Хлороформную фракцию упаривали в вакууме при температуре 30 °С. К полученному липидному остатку добавляли гексан и 85% водный этанол в соотношении 1 : 1. Смесь встряхивали в делительной воронке. Гексановую фракцию отделяли, а водно-спиртовую фракцию экстрагировали гексаном еще один раз. Гексановые фракции объединяли и упаривали при температуре 25–30 °С в вакууме до постоянной массы. Выход конечного продукта составил 0,6 г на 100 г сырой массы гонад. В 1 г полученной липидной фракции содержалось 48 мг α-токоферола.

Пример 2. Из 20 г гонад черноморских мидий, используя приемы, описанные в примере 1, получали липидную фракцию с выходом 0,17 г. Содержание α-токоферола — 57 мг на 1 г липидной фракции.

Вещество, полученное предложенным способом, обладает низкой токсичностью и не вызывает гибели мышей, а также других токсических явлений при изученной схеме лечения [4, 54]. Заявленный способ позволяет увеличить выход конечного продукта на 12–13%, уменьшает в 1,5–2 раза время экстракции, и, не угнетая природных качеств препарата, сохраняет показатели противоопухолевой активности.

**Заключение по 6 главе.** Изучив особенности накопления и экскреции физиологически активных веществ липидной природы в гонадах и половых продуктах мидии *Mytilus galloprovincialis*, были разработаны и запатентованы 4

технологии выделения, очистки и применения этих соединений: «Способ получения биологически активного вещества из черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam» [56]; «Способ получения функционального продукта из мидии *Mytilus galloprovincialis*» [52]; «Способ получения масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами из мидии *M. galloprovincialis*» [51]; «Способ получения вещества из гонад мидии *M. galloprovincialis*, обладающего противоопухолевой активностью» [50]. Кроме того, разработан метод выделения из оплодотворенных яйцеклеток *M. galloprovincialis* и фиксации в спирте эмбриональных тотипотентных клеток. Эмбриональные тотипотентные клетки моллюсков могут быть не только сырьем для лечебно-профилактических и косметических препаратов, но и объектом изучения процессов, регулирующих морфогенетические функции ядер, что недоступно для изучения на клетках человеческих эмбрионов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опираясь на полученные данные и на современные научные концепции, можно утверждать, что тестостерон, эстрадиол, жирные кислоты и микроэлементы в гонадах мидии *M. galloprovincialis* имеют экзогенное происхождение. В литературе существует масса критики в ответ на попытки измерения концентрации тестостерона в теле беспозвоночных, так как на планете нет мест, где бы отсутствовал тестостерон, выделяемый позвоночными. Определение концентраций тестостерона, эстрадиола, жирных кислот и микроэлементов в гонадах, половых продуктах и трохофорах мидий указывает на взаимосвязанное участие физиологически активных веществ в жизненном цикле моллюсков. Стероиды, вне зависимости от происхождения, вовлечены в цикл размножения мидий, так как регулируют гаметогенез, о чем говорит снижение уровня гормонов в гонадах моллюсков по мере их созревания. Обнаружены различия в соотношении уровней тестостерона и эстрадиола в процессе репродуктивного цикла у самцов и самок. Максимальная концентрация тестостерона отмечена в сперматозоидах, эстрадиола — в гонадах самок на третьей стадии репродуктивного цикла и в яйцеклетках. Тестостерон и эстрадиол экскретируются моллюсками вместе с половыми продуктами в водную среду. Экскреция стероидов необходима мидиям как механизм размножения и для поддержания баланса между свободными и конъюгированными с жирными кислотами формами стероидов. Экзогенный тестостерон и эстрадиол активно участвуют в жизнедеятельности, как самих мидий, так и других беспозвоночных.

Анализ жирных кислот в гонадах и половых продуктах мидии *M. galloprovincialis* подтверждает, что ЖК-состав, аналогично стероидам, изменяется в процессе репродуктивного цикла. В гонадах самок преобладают НЖК, у самцов — МНЖК и ПНЖК. В яйцеклетках содержание НЖК выше, чем в сперматозоидах. ПНЖК доминируют над НЖК и МНЖК в сперматозоидах и в яйцеклетках.

Жирные кислоты поступают в организм мидий преимущественно вместе с питанием. Изменение концентрации жирных кислот в гонадах по стадиям репродуктивного цикла показывает, что они вовлечены в процесс размножения мидий. Увеличение доли ПНЖК в сперме мидий способствует выживанию сперматозоидов до момента, пока последние не достигнут пассивно перемещающихся яйцеклеток, в липидной фракции которых доминируют НЖК.

Концентрация жирных кислот и половых стероидов в гонадах и в половых продуктах мидий, не является постоянной величиной и зависит от факторов среды обитания, особенно от влияния хлорорганических загрязнителей. В организме мидий ХОС вместе с липидами включаются в метаболические процессы и во время гаметогенеза перераспределяются в тканях гонад, яйцеклеток и сперматозоидов. Коэффициент накопления  $\Sigma\text{ПХБ}_5$  и  $\Sigma\text{ДДТ}$  в гонадах самок в несколько раз выше, чем у самцов.

Действие полихлорбифенилов на трохофоры мидий аналогичны воздействию органических загрязнителей на гонады и половые продукты. Увеличение концентрации ненасыщенных жирных кислот в личинках под воздействием даже минимальных концентраций загрязнителей говорит о защитной реакции организма. При высоких концентрациях ЖК-отклик минимален, так как эти концентрации губительны для живого организма. При низких и средних концентрациях поллютантов увеличивается содержание ПНЖК в личинках, а при высоких — ЖК-отклик практически не отличается от контроля. Изменяется содержание пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот. Это связано с ведущей ролью этих кислот в связывании как стероидных гормонов, так и органических поллютантов. Питаясь пассивно, личинки потребляют как загрязнители, так, вероятно, и стероидные гормоны из среды обитания. Мидии способны накапливать и экскретировать в водную среду ХОС, подобно стероидам. ХОС влияют на ЖК-состав мидий. Очевидно, что для оценки влияния загрязнителей на биосинтез и

метаболизм тестостерона и эстрадиола в моллюсках необходима информация о ферментативных путях синтеза стероидов и их дальнейших превращениях, но сведения об этих явлениях все еще фрагментарны.

Гонады, половые продукты и личинки черных и коричневых цветовых морф мидий отличаются по элементному составу. Концентрации макро- и микроэлементов в гонадах связаны с ростом и размножением моллюсков. В гонадах самцов и самок черных и коричневых цветовых морф мидий достоверных различий в элементном составе не отмечено, а в половых продуктах и личинках различия достоверны. Это показывает, что мидии разных цветовых морф развиваются с разной интенсивностью, что приводит к отличиям в биохимическом составе моллюсков, относящимся к одному виду. В гонадах и половых продуктах коричневых мидий содержание углерода, следовательно, содержание органических соединений, например жирных кислот, выше, чем в черных мидиях. В черных моллюсках повышено количество серосодержащих аминокислот. Содержание Se и Zn в моллюсках черной морфы больше.

Концентрации Se и Zn в гонадах и половых продуктах самок и самцов мидий изменяются аналогично концентрациям стероидных гормонов и зависят от репродуктивного цикла моллюсков. Микроэлементы экскретируются моллюсками в водную среду вместе с половыми продуктами. В весенний период во время массового нереста в половые продукты полностью переходит тестостерон, эстрадиол и Se. Zn экскретируется частично. Скорее всего, это связано с порционным нерестом мидий. На примере Se и Zn в весенний период рассчитаны значения степени усвоения этих элементов гонадами мидий из пищи и предельный коэффициент пищевого накопления этих металлов. В гонадах мидий в весенний период рассчитанные значения степени усвоения пищи на рост ( $q$ ) для Se колеблются в диапазоне от 0,1 до 0,4, что ниже среднегодовых значений степени усвоения пищи на рост  $q_{п}$  ( $K_2$ ), равных 0,14 и 0,42. Рассчитанные значения  $q$  для Zn — от 0,1 до 0,6,

что выше среднегодовых значений степени усвоения пищи на рост  $q_{\text{п}}$  ( $K_2$ ), равных 0,14 и 0,42. Поэтому можно утверждать, что Se и Zn экскретируются с разной интенсивностью.

Значения максимального коэффициента пищевого накопления  $K_{\text{п}}$  для Se и Zn в гонадах мидий в весенний период выше степени усвоения и вовлечения в биохимические процессы ( $q$ ) рассматриваемых микроэлементов. Этот факт еще раз подтверждает экскрецию Se и Zn из организма мидий.

Изучив особенности накопления и экскреции физиологически активных веществ липидной природы в мидии *M. galloprovincialis*, разработаны технологии выделения, очистки и применения этих соединений, что открывает перспективы дальнейшего использования моллюсков в биотехнологических целях.

## ВЫВОДЫ

1. Концентрации тестостерона и эстрадиола в гонадах мидий зависят от половой принадлежности, стадии репродуктивного цикла и соответствует сезонному циклу размножения моллюсков. На начальных стадиях репродуктивного цикла и перед нерестом в гонадах самцов повышается содержание тестостерона. Максимальная концентрация тестостерона обнаружена в сперматозоидах, эстрадиола — в гонадах самок на 3-й стадии репродуктивного цикла.

2. Состав ЖК в гонадах мидий зависит от половой принадлежности, стадии репродуктивного цикла и степени загрязненности среды обитания ПХБ. В гонадах самцов преобладают МНЖК и ПНЖК. ПНЖК доминируют в сперматозоидах. В гонадах самок и личинках доминируют НЖК.

3. Уровень биоаккумуляции хлорорганических соединений в гонадах мидий повышается с ростом количества липидов в моллюсках и концентрации загрязнителя в воде. Вымет половых продуктов уменьшает содержание ХОС в гонадах мидий вследствие передачи ХОС в яйцеклетки и сперматозоиды, и с ними — в морскую среду. ПХБ влияют на ЖК-состав личинок (трохофор) мидий. С увеличением концентрации полихлорбифенилов в среде выращивания личинок увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот и снижается доля насыщенных жирных кислот.

4. Установлены статистически значимые различия в элементном составе гонад, половых продуктов и трохофор различных полов черных и коричневых мидий. В гонадах самцов и самок черных и коричневых мидий отсутствуют достоверные различия в макроэлементном (С, О, N, P, S) составе, тогда как в половых продуктах и личинках различия существенны. В гонадах самок коричневых и черных мидий преобладает Cu, Fe и As, но в гонадах коричневых мидий

содержание этих элементов достоверно ниже, чем в черных. Содержание Zn и Se в моллюсках с черными раковинами выше.

5. Во время нереста тестостерон, эстрадиол, жирные кислоты и элементы экскретируются из гонад вместе с половыми продуктами в окружающую среду. Экскреция стероидов необходима для размножения мидий и поддержания в организме равновесия между свободными и конъюгированными с жирными кислотами формами стероидов.

6. Разработаны и запатентованы 4 новые технологии получения лечебно-профилактических продуктов из мидии *M. galloprovincialis*: препарат, стимулирующий половое поведение; вещество, обладающего противоопухолевой активностью; функциональный продукт на основе эмбриональных тотипотентных клеток; масляная композиция, обогащенная витамином E и ПНЖК.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АСТ — аспаратаминотрансфераза;

БАВ — биологически активные вещества;

г — грамм;

г. — год;

ДДД — 4,4'-дихлордифенилдихлорметилметан;

ДДТ — дихлордифенилтрихлорэтан;

ДДЭ — 1,1'-дихлор-2,2-бис(p-хлорфенил)этилен;

ЖК — жирные кислоты;

ЖК-состав — состав жирных кислот;

ИФА — иммуноферментный анализ;

кг — килограмм;

л — литр;

м — метр;

мг — миллиграмм;

мин — минута;

мкг — микрограмм;

мкг·г<sup>-1</sup>·сух. — микрограмм на грамм сухой массы;

мл — миллилитр;

млн — миллион;

мм — миллиметр;

МНЖК — мононенасыщенные жирные кислоты;

МЭЖК — метиловые эфиры жирных кислот;

нг·г<sup>-1</sup> — нанограмм на грамм;

НЖК — насыщенные жирные кислоты;

пг·мл<sup>-1</sup> — пикограмм на миллилитр;

ПДК — предельно допустимые концентрации;  
ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты;  
ПП — половые продукты;  
ПХБ — полихлорированные бифенилы;  
с — секунда;  
сут — сутки;  
сух. — сухая масса;  
т — тонна;  
ТБТ — трибутилин;  
ТМБ — тетраметилбензидин;  
ХОП — хлорированные пестициды;  
ХОС — хлорорганические соединения;  
экз. — экземпляров;  
°С — градус Цельсия;  
 $R^2$  — коэффициент детерминации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аболмасова, Г. И. Рост мидии *M. galloprovincialis* на протяжении годового цикла в бухтах Ласпи и Казачья (р-н Севастополя) / Г. И. Аболмасова, С. А. Щербань // Экология моря. — 1991. — Вып. 38. — С. 88–92.
2. Абрамова, Ж. И. Человек и противокислительные вещества / Ж. И. Абрамова, Г. И. Оксенгендлер. — Ленинград : Наука, 1985. — 230 с.
3. Александрова, О. Л. Особенности глутатионпероксидной системы в тканях двух цветовых морф черноморской мидии *M. galloprovincialis* L. / О. Л. Александрова, А. А. Солдатов, И. В. Головина // Экология моря. — 2001. — Вып. 58. — С. 22–26.
4. Апрышко, Г. Н. Противоопухолевые препараты из морских водорослей Средиземноморского бассейна / Г. Н. Апрышко, М. В. Нехорошев, В. Н. Иванов, Н. А. Мильчакова // Альгология. — 2005. — Т. 15, № 4. — С. 485–490.
5. Баранов, В. Г. Физиология эндокринной системы / В. Г. Баранов, Л. Г. Лейбсон, М. И. Митюшов. — Ленинград : Наука, 1979. — 680 с.
6. Вайт, А. Основы биохимии / А. Вайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. — Москва : Мир, 1981. — 536 с.
7. Вараксина, Г. С. Действие эстрадиола, прогестерона и тестостерона на оогенез приморского гребешка / Г. С. Вараксина, А. А. Вараксин // Биология моря. — 1991. — Т. 17, № 3. — С. 61–68.
8. Вараксина, Г. С. Значение половых стероидных гормонов в сперматогенезе приморского гребешка / Г. С. Вараксина, А. А. Вараксин, Л. А. Масленникова // Биология моря. — 1992. — Т. 18, № 1–2. — С. 77–83.
9. Взаимодействие между водой и живым веществом : труды Международного симпозиума, Одесса, 6–10 октября 1975 г. — Москва : Наука, 1979. — Т. 1. — 260 с.

10. Гаврисюк, В. К. Применение Омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в медицине / В. К. Гаврисюк // Украинский пульмонологический журнал. — 2001. — № 3. — С. 5–10.

11. Голубь, Н. А. Биотехнология получения продукта лечебно-профилактического назначения из двустворчатого моллюска мидии / Н. А. Голубь, В. Е. Ерохин, В. И. Рябушко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11, № 2. — С. 11–19.

12. ГОСТ 7636–85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 27 марта 1985 г. № 898. – Взамен ГОСТ 18173-72. — Введен 1986-01-01.— Москва : Стандартиформ, 2010. — 87 с.

13. Иванов, В. Н. Содержание липидов и каротиноидов в выметанных половых продуктах черноморской мидии *M. galloprovincialis* L. / В. Н. Иванов, Н. В. Караванцева, М. В. Нехорошев // Морской экологический журнал. — 2010. — Т. 9, № 1. — С. 84.

14. Исаева, В. В. Стволовые клетки беспозвоночных животных с репродуктивной стратегией, включающей бесполое размножение / В. В. Исаева, А. И. Шукалюк, А. В. Ахмадиева // Биология моря. — 2007. — Т. 33, № 1. — С. 3–10.

15. Капранова, Л. Л. Элементный состав гонад, половых продуктов и личинок черной и коричневой морф двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. / Л. Л. Капранова, В. И. Рябушко, С. В. Капранов, В. Н. Лишаев, М. В. Нехорошев // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2021. — Т. 57, № 6. — С. 531–539. <https://doi.org/10.31857/S004445292106005X>

16. Капранова, Л. Л. Экскреция тестостерона и эстрадиола культивируемой мидией *M. galloprovincialis* L. (Чёрное море) / Л. Л. Капранова // Труды Карадагской

научной станции им. Т. И. Вяземского — природного заповедника РАН. — 2020. — Вып. 2 (14). — С. 56–66. <https://doi.org/10.21072/eco.2021.14.06>

17. Караванцева, Н. В. Методика отбора половых продуктов мидии *M. galloprovincialis* L. / Н. В. Караванцева, Н. В. Поспелова, Н. И. Бобко, М. В. Нехорошев // Системы контроля окружающей среды. — 2012. — № 17. — С. 184–187.

18. Ковалева, Ю. В. Гормоны жировой ткани и их роль в формировании гормонального статуса и патогенезе метаболических нарушений у женщин / Ю. В. Ковалева // Артериальная гипертензия. — 2015. — Т. 21, № 4. — С. 356–370. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2015-21-4-356-370>

19. Козинцев, А. Ф. Накопление тяжелых металлов в мидиях, культивируемых в бухте Казачья Чёрного моря / А. Ф. Козинцев, В. И. Рябушко // Морские биотехнические системы. — 2002. — Вып. 2. — С. 222–230.

20. Композиция ингредиентов для горькой настойки — бальзама : пат. на изобр. 2049813С1 RU : МКИ С 12 G 3/06/ ; заявл. 30.06.1992, опубл. 10.12.1995 / Сиренко В. Г. ; заявитель и патентообладатель Сиренко Владимир Григорьевич.

21. Кудикина, Н. П. Экологические аспекты динамики стероидных гормонов в репродуктивном цикле морских двустворчатых, брюхоногих и головоногих моллюсков / Н. П. Кудикина // Ученые записки Казанского университета. — 2007. — Т. 9, № 3. — С. 214–224.

22. Кузнецова, Л. А. Аденилатциклазная система гладких мышц беспозвоночных и позвоночных как мишень действия глюкагона / Л. А. Кузнецова, С. А. Плеснева, М. Н. Перцева // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 1993. — Т. 29, № 3. — С. 250–257.

23. Кузнецова, Л. А. Биохимические механизмы проведения гормонального сигнала у беспозвоночных /Л. А. Кузнецова, С. А. Плеснева, М. Н. Перцева // Биологические мембраны. — 1991. — Т. 8. — С. 1142–1144.

24. Кулинский, В. И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Успехи современной биологии. — 1993. — Т. 113, вып. 1. — С. 107–122.
25. Левачев, М. М. Жиры рыб в диетологии гиперлипопротеидемии и гипертонии / М. М. Левачев. — Москва : Медицина, 1988. — 150 с.
26. Майофис, Л. С. Химия и технология химико-фармацевтических препаратов / Л. С. Майофис. — Ленинград : МЕДГИЗ, 1968. — 539 с.
27. Малахов, В. В. Эмбриональное развитие двустворчатых моллюсков в норме и при воздействии тяжелых металлов / В. В. Малахов, Л. А. Медведева. — Москва : Наука, 1993. — 134 с.
28. Малахова, Л. В. Загрязненность стойкими хлорорганическими соединениями воды и донных отложений Черного моря (по данным экспедиционных исследований на НИС «Профессор Водяницкий») / Л. В. Малахова, Т. В. Малахова // Загрязнение морской среды: экологический мониторинг, биоиндикация, нормирование : сб. ст. Всерос. науч. конф. с междунар. участием, посвящ. 125-летию проф. В. А. Водяницкого, 28 мая – 01 июня 2018 г., Севастополь. — Севастополь : Колорит, 2018. — С. 142–148.
29. Малахова, Л. В. Мониторинг хлорорганического загрязнения Севастопольской акватории с использованием мидии *M. galloprovincialis* в качестве вида-индикатора / Л. В. Малахова, Т. В. Малахова, Е. С. Щурова, А. К. Карамышев // Морские биологические исследования: достижения и перспективы: в 3-х т. : сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, приуроч. к 145-летию Севастопольской биологической станции, 19–24 сент. 2016 г., Севастополь. — Севастополь : Колорит, 2016. — Т. 3. — С. 140–143.
30. Малахова, Л. В. Современный уровень загрязненности хлорорганическими соединениями донных отложений Украинского шельфа Черного

моря / Л. В. Малахова // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. — 2012. — Вып. 26, № 1. — С. 64–73.

31. Меньшиков, В. В. Обеспечение качества лабораторных исследований. Проаналитический этап / В. В. Меньшиков. — Москва : Юнимед-пресс, 2003. — 206 с.

32. Моисеев, Л. К. Стратификация вод Северной части Атлантического океана / Л. К. Моисеев // Труды ВНИИГМИ-МЦД. — 1980. — Вып. 69. — С. 26–54.

33. Мотавкин, П. А. Гистофизиология нервной системы и регуляция размножения у двустворчатых моллюсков / П. А. Мотавкин, А. А. Вараксин. — Москва : Наука, 1983. — 206 с.

34. Никитина, С. М. Стероидные гормоны беспозвоночных животных / С. М. Никитина. — Ленинград : Изд-во ЛГУ, 1982. — 172 с.

35. Никонова, Л. Л. Хлорорганические соединения в гонадах и половых продуктах двустворчатого моллюска мидии *M. galloprovincialis* L.; 1819, культивируемого у берегов Крыма (Черное море) / Л. Л. Никонова, Л. В. Малахова, М. В. Нехорошев, В. И. Рябушко // Вода: химия и экология. — 2017. — № 3. — С. 40–45.

36. Одинцова, Н. А. Репродукция и дифференцировка клеток двустворчатых моллюсков и иглокожих *in vitro* : дис. ... д-ра биол. наук 03.00.11 : защищена 14.07.1999 / Нэлия Адольфовна Одинцова ; Владивосток, Гос. мед. ун-т. — Владивосток, 1999. — 240 с.

37. Пиркова, А. В. Формирование поселений мидии *M. galloprovincialis* (Lamarck, 1819) на коллекторах фермы в бухте Ласпи в зависимости от экологических факторов // А. В. Пиркова, Л. В. Ладыгина, С. В. Щуров // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. — 2019. — Т. 5 (71), № 1. — С. 92–106.

38. Пиркова, А. В. Эмбрионы мидии *M. galloprovincialis* L. — индикаторы загрязнения морской воды поверхностно-активными веществами / А. В. Пиркова, Л. В. Ладыгина, Н. И. Бобко // Загрязнение морской среды: экологический мониторинг, биоиндикация, нормирование : сб. ст. Всерос. науч. конф. с междунар. участием, посвящ. 125-летию проф. В. А. Водяницкого, , 28 мая – 01 июня 2018 г., Севастополь. — Севастополь : Колорит, 2018. — С. 205–209.

39. ПНД Ф 14.1:2:3:4.204–04. Методика измерений массовых концентраций хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в пробах питьевых, природных и сточных вод методом газовой хроматографии. — Введен 2009 г. — Москва : Аналитический центр контроля качества воды ЗАО «РОСа» : Изд-во ФГБУ «Федеральный центр анализа и оценки техногенного воздействия на окружающую среду» (ФГУ «ФЦЛО»), 2018. — 32 с.

40. Поликарпов, Г. Г. Морская динамическая радиохемозология / Г. Г. Поликарпов, В. Н. Егоров. — Москва : Энергоатомиздат, 1986. — 176 с.

41. Поликарпов, Г. Г. Экологические аспекты изучения загрязнения Черного моря хлорорганическими ксенобиотиками / Г. Г. Поликарпов, Н. В. Жерко // Экология моря. — 1996. — Вып. 45. — С. 92–100.

42. Пospelова, Н. В. Изменчивость кормовой базы двустворчатых моллюсков в двухлетнем цикле выращивания на мидийно-устричной ферме (Чёрное море, Голубой залив) / Н. В. Пospelова, О. А. Троценко, А. А. Субботин // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Сер. Биология. Химия. — 2018. — Т. 4 (70), № 4. — С. 148–164.

43. Пospelова, Н. В. Содержание каротиноидов в системе «взвешенное вещество — мидия (*M. galloprovincialis* L.) — биоотложения мидий» / Н. В. Пospelова, М. В. Нехорошев // Экология моря. — 2003. — Вып. 64. — С. 62–66.

44. Пospelова, Н. В. Содержание меди в органах и тканях *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 и поток её седиментационного депонирования в

донные осадки в хозяйствах черноморской аквакультуры / Н. В. Поспелова, В. Н. Егоров, Н. С. Челядина, М. В. Нехорошев // Морской биологический журнал. — 2018. — Т. 3, № 4. — С. 64–75. <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.4.07>

45. Ровинский, Н. Ф. Унифицированные методы мониторинга фонового загрязнения природной среды / Н. Ф. Ровинский. — Ленинград : Гидрометеиздат, 1986. — 179 с.

46. Рослый, И. М. Биохимические показатели в медицине и биологии / И. М. Рослый. — Москва : Медицинское информационное агентство, 2015. — 609 с.

47. Рябушко, В. И. Концентрация мышьяка в тканях культивируемой мидии *M. galloprovincialis* L., воде и донных осадках (Крым, Черное море) / В. И. Рябушко, А. Ф. Козинце, А. М. Тоичкин // Морской биологический журнал. — 2017. — Т. 2, № 3. — С. 68–74. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.3.06>

48. Рябушко, В. И. Содержание тяжелых металлов в мидии *M. galloprovincialis* L. из бухты Казачья Чёрного моря / В. И. Рябушко, А. Ф. Козинцев, Т. Л. Макарчук, В. К. Шинкаренко // Морские биотехнические системы. — Севастополь. — 2002. — Вып. 2. — С. 215–221.

49. СанПиН 2.3.2.1078–01. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов : утвержден и введен Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 14.11.2001 № 36 (ред. от 06.07.2011) ; зарегистрирован в Минюсте РФ 22.03.2002 № 3326. — Москва, 2011. — 144 с.

50. Способ получения вещества из гонад мидий *M. galloprovincialis*, обладающего противоопухолевой активностью : пат. 2674033 Российская Федерация : МПК А61К 35/618 (2015.01), А61Р 35/00 (2006.01) : № 2017139047 ; заявл. 09.11.2017, опубл. 04.12.2018, Бюл. № 34 / Капранова Л. Л., Рябушко В. И., Нехорошев М. В., Апрышко Г. И. ; заявитель и патентообладатель Федеральное

государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН».

51. Способ получения масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами из мидии *M. galloprovincialis* : пат. 2743019 Российская Федерация : МПК A23D 9/00 (2006.01), C11B 1/10 (2006.01), A23L 33/10 (2016.01) : № 2020121276 ; заявл. 22.06.2020, опубл. 12.02.2021, Бюл. № 5 / Капранова Л. Л., Нехорошев М. В., Рябушко В. И., Капранов С. В. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН».

52. Способ получения функционального продукта из мидии *M. galloprovincialis* : пат. 2743060 Российская Федерация : МПК A23L 33/10 (2016.01); A23L 17/50 (2016.01); C11B 1/10 (2006.01) : № 2020121278; заявл. 22.06.2020, опубл. 15.02.2021, Бюл. № 5 / Капранова Л. Л., Нехорошев М. В., Рябушко В. И., Капранов С. В. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН».

53. Способ обогащения оливкового масла фукоксантином : пат. 2716082 Российская Федерация : МПК A23D 9/00 (2006.01) : № 2019105562 ; заявл. 27.02.2019, опубл. 05.03.2020, Бюл. № 7 / Нехорошев М. В., Бочарова Е. А., Рябушко В. И. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН».

54. Способ получения вещества, обладающего противоопухолевой активностью : пат. 4106 UA. A61K35/56, A61L38/00/ ; заявл. 08.01.2004, опубл. 17.01.2005, Бюл. № 1 / Нехорошев М. В., Иванов В. Н., Филиппов О. В.,

Апрышко Г. Н. ; заявитель и патентообладатель Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины.

55. Способ получения эмбриональных стволовых клеток из черноморской мидии : пат. UA84810 C12N 5/16 (Украина) : МПК A01K61/00 : № a200709248 ; заявл. 13.08.2007, опубл. 10.04.2008, Бюл. № 7 / Иванов В. М. ; заявитель и патентообладатель Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины.

56. Способ получения биологически активного вещества из черноморской мидии *M. galloprovincialis* L. : пат. 2599834 RU : МПК A23L/10, A23L 17/50/ ; заявл. 22.09.2014, опубл. 20.10.2016, Бюл. № 29 / Никонова Л. Л., Нехорошев М. В. ; заявитель и патентообладатель Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского.

57. Способ производства настойки из икры морского ежа : пат. 2209242C1 RU : МКИ С 12 G 3/06 : № 2001132801/13 ; заявл. 13.12.2001, опубл. 27.07.2003 / Хлюстов, Н. А. ; заявитель и патентообладатель Хлюстов Николай Александрович, ООО «Первое частное Приморское патентное агенство».

58. Способ безотходной переработки икры морских ежей : пат. 2283006C1 RU : МПК A23L1/325; B01D11/00 ; заявл. 09.03.2005, опубл. 10.09.2006 / Юрьева М. И., Ковалев Н. Н., Якуш Е. В. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное унитарное предприятие «Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр» ФГУП "ТИНРО-Центр».

59. ТС Т. Р. 021/2011. Технический регламент Таможенного союза о безопасности пищевой продукции : утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880. — Москва, 2011. — 242 с.

60. Финенко, Г. А. Экологическая энергетика черноморских мидий / Г. А. Финенко, З. А. Романова, Г. И. Аболмасова // Биоэнергетика гидробионтов. — Киев : Наукова думка, 1990. — 248 с.

61. Фодченко, И. А. Влияние хлорорганических пестицидов на активность комплекса пептидгидролаз черноморской мидии / И. А. Фодченко, Е. В. Вашик, Т. И. Никитчина, Т. А. Маноли // Ученые записки учебного образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». — 2017. — Т. 53, вып. 4. — С. 71–75.
62. Фокина, Н. Н. Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания / Н. Н. Фокина, З. А. Нефедова, Н. Н. Немова. — Петрозаводск : Изд-во КарНЦ РАН, 2010. — 243 с.
63. Хардин, А. С. Изменение состава жирных кислот гепатопанкреаса моллюска *Mytilus trossulus* в связи с питанием микроводорослями / А. С. Хардин, Н. А. Айздайчер, Н. А. Латышев // Биология моря. — 2003. — Т. 29, № 6. — С. 424–428.
64. Хасанов, В. В. Состав жирных кислот и стероидов растительных масел / В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова, К. А. Дычко, Т. Т. Куряева // Химия растительного сырья. — 2006. — № 3. — С. 27–31.
65. Холодов, В. И. Выращивание мидий и устриц в Черном море / В. И. Холодов, А. В. Пиркова, Л. В. Ладыгина. — Воронеж : ИздатПринт, 2017. — 240 с.
66. Чеботарева, М. А. Предел изменения индекса ненасыщенности жирнокислотного состава фосфолипидов при адаптациях моллюсков к биогенным и абиогенным факторам внешней среды / М. А. Чеботарева, С. А. Забелинский, Е. П. Шуколюкова, А. И. Кривченко // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2011. — Т. 47, № 5. — С. 383–387.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093011050069>
67. Челядина, Н. С. Вариабельность размеров яйцеклеток культивируемой мидии *M. galloprovincialis* L. (Крым, Чёрное море) // Вестник Воронежского

государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2018. — № 3. — С. 154–162.

68. Щербань, С. А. Особенности соматического и генеративного роста у некоторых цветковых морф мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. / С. А. Щербань // Экология моря.— 2000. — Вып. 53. — С. 77–81.

69. Юрьева, М. И. Гонады морских ежей — источник для создания препаратов, стимулирующих половое поведение / М. И. Юрьева, О. В. Лисаковская, В. Н. Акулин, А. В. Кропотов // Биология моря. — 2003. — Т. 29, № 3. — С. 213–216.

70. Abad, M. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain) / M. Abad, C. Ruiz, D. Martinez, G. Mosquera, J. L. Sánchez // Comparative Biochemistry and Physiology. — 1995. — Vol. 110, iss. 2. — P. 109–118. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)00006-A](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)00006-A)

71. Agatemor, C. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: a review / C. Agatemor, D. Beauchemin // Analytica Chimica Acta. — 2011. — Vol. 706, iss. 1. — P. 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.027>

72. Ahsan, U. Role of selenium in male reproduction — a review / U. Ahsan, Z. Kamran, I. Raza, S. Ahmad, W. Babar, M. H. Riaz, Z. Iqbalb // Animal Reproduction Science. — 2014. — Vol. 146, iss. 1–2. — P. 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009>

73. Allen, K. Metabolism of sulfur amino acids in *Mytilus edulis* and *Rangia cuneata* / K. Allen, J. Awapara // Biology Bulletin. — 1960. — Vol. 118, no. 2. — P. 173–182. <https://doi.org/10.2307/1538995>

74. Amelar, R. D. Sperm motility / R. D. Amelar, L. Dubin, C. Y. Schoenfeld // Fertility and Sterility. — 1980. — Vol. 34, iss. 3. — P. 197–215. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)44949-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)44949-6)

75. Amiard, J.-C. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers / J.-C. Amiard, C. Amiard-Triquet, S. Barka,

J. Pellerin, P.S. Rainbow // *Aquatic Toxicology*. — 2006. — Vol. 76, iss. 2. — P. 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>

76. Azpeitia, K. A sensory and nutritional validation of open ocean mussels (*M. galloprovincialis* Lmk.) cultured in SE Bay of Biscay (Basque Country) compared to their commercial counterparts from Galician Rías (Spain) / K. Azpeitia, Y. Rios, I. Garcia, J. Pagaldai, D. Mendiola // *International Aquatic Research*.— 2017. — Vol. 9. — P. 89–106. <https://doi.org/10.1007/s40071-017-0159-0>

77. Bai, X. Uptake of endocrine-disrupting chemicals by quagga mussels (*Dreissena bugensis*) in an urban-impacted aquatic ecosystem / X. Bai, K. Acharya // *Environmental Science and Pollution Research*. — 2019. — Vol. 26, iss. 1. — P. 250–258. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3320-4>

78. Ballarin, L. Maristem-stem cells of marine/aquatic invertebrates: from basic research to innovative applications / L. Ballarin, B. Rinkevich, K. Bartscherer, A. Burzynski, S. Cambier, M. Cammarata, I. Domart-Coulon, D. Drobne, J. Encinas, U. Frank, A-M. Geneviere, B. Hobmayer, H. Löhelaid, D. Lyons, P. Martinez, P. Oliveri, L. Peric, S. Piraino, A. Ramšak, S. Rakers, F. Rentzsch, A. Rosner, T. H. Silva, I. Somorjai, S. Suleiman, A. V. Coelho // *Sustainability*. — 2018. — Vol. 10, iss. 2. — Article no. 526. <https://doi.org/10.3390/su10020526>

79. Bat, L. Copper, zinc, lead and cadmium concentrations in the Mediterranean mussel *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 from the Sinop coast of the Black Sea / L. Bat, A. Gündoğdu, M. Öztürk, M. Öztürk // *Turkish Journal of Zoology*. — 1999. — Vol. 23, iss. 4. — P. 321–326.

80. Bayne, B. L. Protein metabolism, the costs of growth and genomic heterozygosity: Experiments with the mussel *M. galloprovincialis* Lmk. / B. L. Bayne, A. J. S. Hawkins // *Physiological Zoology*. — 1997. — Vol. 70, no. 4. — P. 391–402. <https://doi.org/10.1086/515848>

81. Bel'cheva, N. N. Seasonal variability in the levels of Fe, Zn, Cu, Mn, and Cd in the hepatopancreas of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* / N. N. Bel'cheva, A. V. Silina, E. N. Slin'ko, V. P. Chelomin // *Russian Journal of Marine Biology*. — 2002. — Vol. 28, no. 6. — P. 398–404. <https://doi.org/10.1023/A:1021853215075>
82. Benkendorff, K. Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs / K. Benkendorff // *Biological Reviews*. — 2010. — Vol. 85, iss. 4. — P. 757–775. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00124.x>
83. Bennion, M. Trace element fingerprinting of blue mussel (*Mytilus edulis*) shells and soft tissues successfully reveals harvesting locations / M. Bennion, L. Morrison, D. Brophy, J. Carlsson, J. C. Abrahantes, C. T. Graham // *Science of The Total Environment*. — 2019. — Vol. 685. — P. 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.233>
84. Berge, J.-P. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects / J.-P. Berge, G. Barnathan // *Marine Biotechnology I* / Eds: Y. Le Gal, R. Ulber. — Berlin ; Heidelberg : Springer-Verlag, 2005. — P. 49–125. — (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology ; vol. 96). <https://doi.org/10.1007/b135782>
85. Besnard, J.-Y. Seasonal variations of the fatty acid content of the neutral lipids and phospholipids in the female gonad of *Pecten maximus* L. / J.-Y. Besnard, P. Lubet, A. Nouvelot // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry*. — 1989. — Vol. 93, iss. 1. — P. 21–26. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90210-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90210-1)
86. Bezuidenhout, J. Trace elements in Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* from the South African West coast / J. Bezuidenhout, N. Dames, A. Botha, M. V. Frontasyeva, Z. I. Goryainova, D. Pavlov // *Ecological Chemistry and*

Engineering Society. — 2015. — Vol. 22, iss. 4. — P. 489–498.  
<https://doi.org/10.1515/eces-2015-0028>

87. Biomarkers for antioxidant defense and oxidative damage / Eds: G. Aldini, K.-J. Yeum, E. Niki, R. M. Russell. – Singapore : John Wiley & Sons, 2011. — 363 p.

88. Boening, D. W. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters / D. W. Boening // Environmental Monitoring and Assessment. — 1999. — Vol. 55, iss. 3. — P. 459–470. <https://doi.org/10.1023/A:1005995217901>

89. Bonnard, M. Chemical evidence of rare porphyrins in purple shells of *Crassostrea gigas* oyster / M. Bonnard, S. Cantel, B. Boury, I. Parrot // Scientific Reports.— 2020.— Vol. 10, art. no. 12150 (11 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69133-5>

90. Borg, W. Long-lived testosterone esters in the rat / W. Borg, C. Shackleton, S. L. Pahuja, R. B. Hochburg // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1995. — Vol. 92, iss. 5. — P. 1545–1549. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1545>

91. Bowen, H. J. M. Trace elements in biological samples. In: Nuclear Analytical Techniques in Medicine // Nuclear Analytical Techniques in Medicine / Ed. R. Cesareo. – Amsterdam ; Oxford ; New York ; Tokyo : Elsevier, 1988. – Chap. 1. — P. 1–17. — (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry ; vol. 8). [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(08\)70218-X](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(08)70218-X)

92. Brewstev, E. In vitro maintenance of amoebocytes from the American oyster. *Crassostrea virginica* / E. Brewstev, B. Nicholson // Journal of the Fisheries Research Board of Canada. — 1979. — Vol. 36, iss. 4. — P. 461–467. <https://doi.org/10.1139/f79-064>

93. Caers, M. The effect of lipid supplementation on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* spat / M. Caers, P. Coutteau, P. Lombeida, P. Sorgeloos // Aquaculture. — 1998. — Vol. 162, iss. 3–4. — P. 287–299. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00221-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00221-X)

94. Calder, P. C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids / P. C. Calder // *The Journal of Nutrition*. — 2012. — Vol. 142, iss. 3. — P. 592S–599S. <https://doi.org/10.3945/jn.111.155259>

95. Capuzzo, J. M. The relationship between lipid composition and seasonal differences in the distribution of PCBs in *Mytilus edulis* L. / J. M. Capuzzo, J. W. Farrington, P. Rantamäki, C. H. Clifford, B. A. Lancaster, D. F. Leavitt, J. Xiaoping // *Marine Environmental Research*. — 1989. — Vol. 28, iss. 1–4. — P. 259–264. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(89\)90240-7](https://doi.org/10.1016/0141-1136(89)90240-7)

96. Carean, S. The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the *Sepia officinalis* / S. Carean, M. Drosdowsky // *General and Comparative Endocrinology*. — 1977. — Vol. 33, iss. 4. — P. 554–565. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(77\)90116-2](https://doi.org/10.1016/0016-6480(77)90116-2)

97. Carro, N. Possible influence of lipid content on levels of organochlorine compounds in mussels from Galicia coast (Northwestern, Spain). Spatial and temporal distribution patterns / N. Carro, I. García, M. Ignacio, A. Mouteira // *Environment International*. — 2004. — Vol. 30, iss. 4. — P. 457–466. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00172-7)

98. Casas, S. Relation between metal concentration in water and metal content of marine mussels (*M. galloprovincialis*): impact of physiology / S. Casas, J. L. Gonzalez, B. Andral, D. Cossa // *Environmental Toxicology and Chemistry*. — 2008. — Vol. 27, iss. 7. — P. 1543–1552. <https://doi.org/10.1897/07-418.1>

99. Çevik, U. Assessment of metal element concentrations in mussel (*M. galloprovincialis*) in Eastern Black Sea, Turkey / U. Çevik, N. Damla, A. I. Kobya, V. N. Bulut, C. Duran, G. Dalgıç, R. Bozacı, J. Hazard // *Journal of Hazardous Materials*. — 2008. — Vol. 160, iss. 2–3. — P. 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.010>

100. Conquer, J. A. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. asthenozoospermic males / J. A. Conquer,

J. B. Martin, I. Tummon, L. Watson, F. Tekpetey // *Lipids*. — 1999. — Vol. 34, iss. 8. — P. 793–799. <https://doi.org/10.1007/s11745-999-0425-1>

101. Crews, D. The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs / D. Crews, J. Bergeron, J. McLachlan // *Environmental Health Perspectives*. — 1995. — Vol. 103. — P. 73–77. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s773>

102. Cronan, J. E. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways / J. E. Cronan, J. Thomas // *Methods in Enzymology*. — 2009. — Vol. 459. — P. 395–433. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04617-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04617-5)

103. Dembitsky, V. M. Allenic and cumulenic lipids / V. M. Dembitsky, T. Maoka // *Progress in Lipid Research*. — 2007. — Vol. 46, iss. 6. — P. 328–375. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.07.001>

104. Dernekbaşı, S. The fatty acid composition of cultured mussels (*M. galloprovincialis* Lamarck 1819) in offshore longline system in the Black Sea / S. Dernekbaşı, A. Öksüz, S. Dernekbaşı, A. Öksüz, M. Y. Çelik, İ. Karayücel, S. Karayücel // *Journal of Aquaculture & Marine Biology*. — 2015. — Vol. 2, iss. 6. — Art. no. 00049 (5 p.). <https://doi.org/10.15406/jamb.2015.02.00049>

105. Dridi, S. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia / S. Dridi, S. M. Romdhane, M. Elcafsi // *Aquaculture*. — 2007. — Vol. 263, iss. 1–4. — P. 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.028>

106. Duursma, E. K. Partitioning of organochlorines between water, particulate matter and some organisms in estuarine and marine systems of the Netherlands / E. K. Duursma, J. Nieuwenhuize, J. M. Van Liere, M. T. J. Hillebrand // *Netherlands Journal of Sea Research*. — 1986. — Vol. 20, iss. 2–3. — P. 239–251. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(86\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0077-7579(86)90046-3)

107. Egorov, V. N. Content of  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{40}\text{K}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{210}\text{Po}$  radionuclides and some chemical pollutants in the Black Sea mussels, *M. galloprovincialis* L. / V. N. Egorov, G. E. Lazorenko, N. Y. Mirzoeva, N. A. Stokozov, S. K. Kostova, L. V. Malakhova, A. V. Pirkova, S. I. Arkhipova, N. F. Korkishko, V. N. Popovichev, O. V. Plotitsyna, L. V. Migal // Marine Ecological journal. — 2006. — Vol. 5, iss. 3. — P. 70–78.

108. Ekin, I. A comparison of the fatty acid composition of the phospholipid and neutral lipid of *Unio elongatulus* (Bourguignat, 1860) (Bivalvia: Unionidae) mussels from 4 different localities in southeastern Anatolia, Turkey / İ. Ekin, M. Başhan, R. Şeşen // Turkish Journal of Zoology. — 2011. — Vol. 35, iss. 6. — P. 837–849. <https://doi.org/10.3906/zoo-1002-5>

109. Ekin, I. Fatty acid composition of selected tissues of *Unio elongatulus* (Bourguignat, 1860) (Mollusca: Bivalvia) collected from Tigris River, Turkey / I. Ekin, M. Başhan // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. — 2010. — Vol. 10, iss. 4. — P. 445–451.

110. Endon, M. Culture of mantle epithelial cells expressing shell matrix proteins from scallop *Patinopecten yessoensis* / M. Endon, Y. Hasegawa // Fisheries Science. — 2006. — Vol. 72, iss. 6. — P. 1277–1285. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01286.x>

111. Evans-Illidge, E. A. Phylogeny drives large scale patterns in Australian marine bioactivity and provides a new chemical ecology rationale for future biodiscovery / E. A. Evans-Illidge, M. Logan, J. Doyle, J. Fromont, C. N. Battershill, G. Ericson, C. W. Wolff, A. Muirhead, P. Kearns, D. Abdo, S. Kininmonth, L. Llewellyn // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, iss. 9. — Article e73800 (13 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073800>

112. Ezgeta-Balić, D. Seasonal fatty acid profile analysis to trace origin of food sources of four commercially important bivalves / D. Ezgeta-Balić, M. Najdek,

M. Peharda, M. Blažina // *Aquaculture*. — 2012. — Vol. 334–337. — P. 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.041>

113. Falchuk, K. H. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos / K. H. Falchuk, M. Montorzi // *Biometals*. — 2001. — Vol. 14, iss. 3–4. — P. 385–395. <https://doi.org/10.1023/a:1012994427351>

114. Fathimath, M. Accumulation of trace elements in aquatic food chains due to sea-fill activities: a thesis submitted to the university of canterbury in partial fulfilment of the requirements for the degree of doctor of philosophy : A thesis / M. Fathimath ; Department of Chemistry College of Science University of Canterbury. – Christchurch, New Zealand, 2015. — 313 p.

115. Fernandes, D. Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs / D. Fernandes, B. Loi, C. Porte // *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. — 2011. — Vol. 127, iss. 3–5. — P. 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.12.009>

116. Fernandes, D. Does exposure to testosterone significantly alter endogenous metabolism in the marine mussel *M. galloprovincialis*? / D. Fernandes, J. C. Navarro, C. Riva, S. Bordonali, C. Porte // *Aquatic Toxicology*. — 2010. — Vol. 100, iss. 4. — P. 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.003>

117. Fernández, A. Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland / A. Fernández, U. Grienke, A. Soler-Vila, F. Guihéneuf, D. B. Stengel, D. Tasdemir // *Food Chemistry*. — 2015. — Vol. 177. — P. 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.062>

118. Feswick, A. An inter-laboratory study on the variability in measured concentrations of 17 $\beta$ -estradiol, testosterone, and 11-ketotestosterone in white sucker: implications and recommendations / A. Feswick, G. T. Ankley, N. Denslow, L. E. Ellestad, M. Fuzzen, K. M. Jensen, K. Kroll, A. Lister, D. L. MacLatchy, M. E. McMaster, E. F. Orlando, M. R. Servos, G. R. Tetreault, M. R. Van Den Heuvel, K. R. Munkittrick //

Environmental Toxicology and Chemistry. — 2014. — Vol. 33, iss. 4. — P. 847–57.  
<https://doi.org/10.1002/etc.2503>

119. Fingerman, M. Vertebrate-type hormones in crustaceans: localization, identification and functional signification / M. Fingerman, R. Nagabhushanam, K. Sarojini // Zoological Science. — 1993. — Vol. 10, iss. 1. — P. 13–29.

120. Fisher, N. S. Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions / N. S. Fisher, J.-L. Teyssié, S. W. Fowler. W.-X. Wang // Environmental Science & Technology. — 1996. — Vol. 30, iss. 11. — P. 3232–3242. <https://doi.org/10.1021/es960009u>

121. Fokina, N. N. Lipid Composition Modifications in the Blue Mussels *Mytilus edulis* L. from the White Sea / N. N. Fokina, T. R. Ruokolainen, N. N. Nemova // Organismal and Molecular Malacology / Ed. S. Ray. — Rijeka, Croatia, 2017. — Chap. 7. — P. 143–159. <https://doi.org/10.5772/67811>

122. Fowler, S. W. Critical review of selected heavy metal and chlorinated hydrocarbon concentrations in the marine environment / S. W. Fowler // Marine Environmental Research. — 1990. — Vol. 29, iss. 1. — P. 1–64. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(90\)90027-L](https://doi.org/10.1016/0141-1136(90)90027-L)

123. Fredericq, I. Sur la concentration molcculaire du sang et des tissus chez les animaux aquatique / I. Fredericq // Archives of Biological Sciences. — 1904. — Vol. 20. — P. 701–739.

124. George, S. G. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals // Heavy Metals in the Marine Environment / Eds: R. W. Furness, P. S. Rainbow. — Boca Raton : CRC Press, 1990. — P. 123–142. <https://doi.org/10.1201/9781351073158>

125. Goede, A. A. Selenium concentrations in the marine invertebrates *Macoma balthica*, *Mytilus edulis*, and *Nereis diversicolor* / A. A. Goede, H. Th. Wolterbeek,

M. J. Koese // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. — 1993. — Vol. 25. — P. 85–89. <https://doi.org/10.1007/BF00230716>

126. Goldstone, J. V. Genetic and structural analyses of cytochrome P450 hydroxylases in sex hormone biosynthesis: sequential origin and subsequent coevolution / J. V. Goldstone, M. Sundaramoorthy, B. Zhao, M. R. Waterman, J. J. Stegeman, D. C. Lamb // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 2015. — Vol. 94 (Pt. B). — P. 676–687. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.012>

127. Gooding, M. P. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta* / M. P. Gooding, G. A. LeBlanc // General and Comparative Endocrinology. — 2001. — Vol. 122, iss. 2. — P. 172–180. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7630>

128. Gooding, M. P. Seasonal variation in the regulation of testosterone levels in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta* / M. P. Gooding, G. A. LeBlanc // Invertebrate Biology. — 2004. — Vol. 123, iss. 3. — P. 237–243. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2004.tb00158.x>

129. Gosling, E. Marine Bivalve Molluscs. 2-nd edition / E. Gosling. — Hoboken : Wiley-Blackwell, 2015. — 524 p. <https://doi.org/10.1002/9781119045212>

130. Gottfried, H. Steroids of invertebrates: in vitro production of 11-ketotestosterone and other steroids by the eggs of slug, *Arion ater rufus* (Linn.) / H. Gottfried, O. Lusi // Nature. — 1966. — Vol. 212. — P. 1488–1489. <https://doi.org/10.1038/2121488a0>

131. Gray, J. S. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist / J. S. Gray // Marine Pollution Bulletin. — 2002. — Vol. 45, iss. 1–12. — P. 46–52. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00323-X)

132. Giusti, A. Esterification of vertebrate like steroids in molluscs: A target of endocrine disruptors? / A. Giusti, C. Joaquim-Justo // Comparative Biochemistry and

Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. — 2013. — Vol. 158, iss. 4. — P. 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.08.003>

133. Guo, H. Identification of Cytochrome P450 (CYP) genes in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) / H. Guo, Z. Bao, H. Du, L. Zhang, S. Wang, L. Sun, X. Mou, X. Hu // Journal of Ocean University of China. — 2013. — Vol. 12, iss. 1. — P. 97–102. <https://doi.org/10.1007/s11802-013-1967-5>

134. Guocheng, H. Concentrations and accumulation features of organochlorine pesticides in the baiyangdian lake freshwater food web of North China / H. Guocheng, D. Jiayin, M. Bixian, L. Xiaojun, C. Hong, W. Jianshe, L. Fengchao, X. Muqi // Environmental Contamination and Toxicology. — 2010. — Vol. 58. — P. 700–710. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9400-1>

135. Hadj, Z. *M. galloprovincialis* as Mussel Watch for butyltins, tin, copper and zinc contamination, from antifouling paint particles, in west algerian coastal waters / Z. Hadj, Z. Boutiba, B. Belbachir // Journal of Environmental Protection. — 2012. — Vol. 3, no. 9. — P. 1047–1053. <https://doi.org/10.4236/jep.2012.39122>

136. Hagerman, D. D. Estrogens in marine invertebrates / D. D. Hagerman, F. N. Wellington, C. A. Vilee // Biological Bulletin. — 1957. — Vol. 112, iss. 2. — P. 180–183. <https://doi.org/10.2307/1539196>

137. Harwood, J. L. The versatility of algae and their lipid metabolism. Biochimie / J. L. Harwood., I. A. Guschina // Biochimie. — 2009. — Vol. 91, iss. 6. — P. 679–684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.004>

138. Henry, J. In vitro stimulation by progesterone of the main nidamental glands biosyntheses in the innerva cephalopod *Sepia officinalis* L. / J. Henry, E. Boucaud-Camou // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. — 1994. — Vol. 108, iss. 1. — P. 25–30. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90049-3)

139. Hongwei, Y. Seasonal changes of oestradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in the gonad of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818) /

Y. Hongwei, Q. Li, L. Wenguang, K. Qiaozhen, Y. Ruihai, L. Kong // Journal of Molluscan Studies. — 2011. — Vol. 77, iss. 2. — P. 116–122. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyq045>

140. Hu B.-Q. Cloning and expression of selenoprotein W from pearl mussels *Cristaria plicata* / B.-Q. Hu, Yi. Liu, C.-G. Wen, A.-H. Li, X.-P. Hu, D. Wu, X.-J. Hua, Z.-Y. Tao // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. — 2014. — Vol. 167. — P. 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.09.008>

141. Islam, S. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis / S. Islam, M. Tanaka // Marine Pollution Bulletin. — 2004. — Vol. 48, iss. 7–8. — P. 624–649. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.004>

142. Janeczko, A. Mammalian sex hormones in plants / A. Janeczko, A. Skoczowski // Folia Histochemica et Cytobiologica. — 2005. — Vol. 43, iss. 2. — P. 71–79.

143. Janer, G. Effects of 17-Estradiol exposure in the mussel *M. galloprovincialis*: the regulating role of steroid acyltransferases / G. Janer, R. Lavado, R. Thibaut, C. Porte // Aquatic Toxicology. — 2005. — Vol. 75, iss. 1. — P. 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.01.012>

144. Janer, G. Esterification of vertebrate-type steroids in the Eastern oyster *Crassostrea virginica* / G. Janer, S. Mesia-Vela, C. Porte, F. C. Kauffman // Steroids. — 2004. — Vol. 69, iss. 2. — P. 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.12.002>

145. Janer, G. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates / G. Janer, C. Porte // Ecotoxicology. — 2007. — Vol. 16, iss. 1. — P. 145–160. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0110-4>

146. Janer, G. Steroid levels, steroid metabolic pathways and their modulation by endocrine disruptors in invertebrates : Thesis / G. Janer. — Barcelona : Universidad Aut6noma de Barcelona, 2006. — 268 p.

147. Janer, G. A comparative study on androgen metabolism in three invertebrate species / G. Janer, G. A. LeBlanc, C. Porte // General and Comparative Endocrinology. — 2005. — Vol. 143, iss. 3. — P. 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.03.016>

148. Jenkins, J. A. Sperm quality biomarkers complement reproductive and endocrine parameters in investigating environmental contaminants in common carp (*Cyprinus carpio*) from the lake Mead National Recreation Area / J. A. Jenkins, M. R. Rosen, R. O. Draugelis-Dale, K. R. Echols, L. Torres, C. M. Wieser, C. A. Kersten, S. L. Goodbred // Environmental Research. — 2018. — Vol. 163. — P. 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.041>

149. Jenkins, R. L. Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: a model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent / R. L. Jenkins, E. M. Wilson, R. A. Angus, W. M. Howell, M. Kirk, R. Moore, M. Nance, A. Brown // Environmental Health Perspectives. — 2004. — Vol. 112, no. 15. — P. 1508–1511. <https://doi.org/10.1289/ehp.7161>

150. Joseph, J. D. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca / J. D. Joseph // Progress in Lipid Research. — 1982. — Vol. 21, iss. 2. — P. 109–153. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(82\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0163-7827(82)90002-9)

151. Kabeya, N. Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals / N. Kabeya, M. M. Fonseca, D. E. K. Ferrier, J. C. Navarro, L. K. Bay, D. S. Francis, D. R. Tocher, L. F. C. Castro, 6. Monroig // Science Advances. — 2018. — Vol. 4, no. 5. — Article eaar6849 (9 p.). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar6849>

152. Kanazawa, A. Sterols in marine invertebrates / Akio Kanazawa // Fisheries Science. — 2001. — Vol. 67, iss. 6. — P. 997–1007. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00354.x>

153. Kapranov, S. Sex- and sexual maturation-related aspects of the element accumulation in soft tissues of the bivalve *M. galloprovincialis* L. collected off coasts of Sevastopol (southwestern Crimea, Black Sea) / S. Kapranov, N. Karavantseva, N. Bobko, V. Ryabushko, L. Kapranova // Environmental Science and Pollution Research. — 2021. — Vol. 28, iss. 17. — P. 21553–21576. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12024-z>

154. Kapranova, L. L. Fatty acid composition in trochophores of mussel *M. galloprovincialis* grown under contamination with polychlorinated biphenyls / L. L. Kapranova, L. V. Malakhova, M. V. Nekhoroshev, V. V. Lobko, V. I. Ryabushko // Marine Biological Journal. — 2020. — Vol. 5, iss. 2. — P. 38–49. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.04>

155. Kapranova, L. L. Fatty acid composition of gonads and gametes in the Black Sea bivalve mollusk *M. galloprovincialis* L. at different stages of sexual maturation / L. L. Kapranova, M. V. Nekhoroshev, L. V. Malakhova, V. I. Ryabushko, S. V. Kapranov, T. V. Kuznetsova // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2019. — Vol. 55, iss. 6. — P. 448–455. <https://doi.org/10.1134/S0022093019060024>

156. Klimova, T. N. Ichthyoplankton in the plankton community of the crimean peninsula shelf zone (Black Sea) in July 2010 / T. N. Klimova, I. V. Vdodovich, Yu. A. Zagorodnyaya, S. M. Ignatyev, L. V. Malakhova, V. S. Dotsenko // Journal of Ichthyology. — 2014. — Vol. 54, iss. 6. — P. 409–421. <https://doi.org/10.1134/S0032945214030060>

157. Kopp, T. I. Genetic polymorphism in selenoprotein P modifies the response to selenium-rich foods on blood levels of selenium and selenoprotein P in a randomized dietary intervention study in Danes / T. I. Kopp, M. Outzen, A. Olsen, U. Vogel, G. Ravn-

Haren // Genes and Nutrition. — 2018. — Vol. 13, art. no. 20 (10 p.).  
<https://doi.org/10.1186/s12263-018-0608-4>

158. Koral, S. Doğu Karadeniz'deki Kara Midyenin (*M. galloprovincialis* Lamarck, 1819) Amino Asit ve Yağ Asidi Kompozisyonunun Mevsimsel Değişiminin Belirlenmesi / S. Koral, B. Süleyman // Yunus Araştırma Bülteni.— 2017. — Vol. 17 (1). — P. 17–28. <https://doi.org/10.17693/yunusae.v17i26557.274790>

159. Kraffe, E. A striking parallel between cardiolipin fatty acid composition and phylogenetic belonging in marine bivalves: a possible adaptative evolution? / E. Kraffe, J. Grall, M. Le Duff, P. Soudant, Y. Marty // Lipids. — 2008. — Vol. 43, iss. 10. — P. 961–970. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3219-9>

160. Kuang, H. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for dibutyl phthalate in liquor / H. Kuang, L. Liu, L. Xu, W. Ma, L. Guo, L. Wang, C. Xu // Sensors. — 2013. — Vol. 13, iss. 7. — P. 8331–8339. <https://doi.org/10.3390/s130708331>

161. Kulikova, A D. The activity of transaminases in the tissues of the Black-Sea mollusk *Mytilus galloprovincialis* / A. D. Kulikova, A. A. Soldatov , T. I. Andreenko // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2015. — Vol. 51, iss. 1. — P. 23–31. <https://doi.org/10.1134/S0022093015010044>

162. Kulikova, A. D. Activity of aldolase in tissues of *M. galloprovincialis* with different shells color / A. D. Kulikova, T. Andreenko, A. A. Soldatov // Hydrobiological Journal. — 2015. — Vol. 51, iss. 6. — P. 53–59. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v51.i6>

163. Lafont, R. Reverse endocrinology, or «hormones» seeking functions / R. Lafont // Insect Biochemistry. — 1991. — Vol. 21, iss. 7. — P. 697–721. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(91\)90112-R](https://doi.org/10.1016/0020-1790(91)90112-R)

164. Lafont, R. Steroids in aquatic invertebrates / R. Lafont, M. Mathieu // Ecotoxicology. — 2007. — Vol. 16, iss. 1. — P. 109–130. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0113-1>

165. Lavado, R. Steroid levels and steroid metabolism in the Mussel *Mytilus edulis*: the modulating effect of dispersed crude oil and alkylphenols / R. Lavado, G. Janer, C. Porte // Aquatic Toxicology. — 2006. — Vol. 78. — P. 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.018>

166. LeBlanc, G. A. Testosterone – fatty acid esterification: a unique target for the endocrine toxicity of tributyltin to gastropods / G. A. LeBlanc, M. P. Gooding, R. M. Sternberg // Integrative and Comparative Biology. — 2005. — Vol. 45, iss. 1. — P. 81–87. <https://doi.org/10.1093/icb/45.1.81>

167. LeBlanc, G. A. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail *Ilyanassa obsoleta* / G. A. LeBlanc // Environmental Health Perspectives. — 2003. — Vol. 111, iss. 4. — P. 426–430. <https://doi.org/10.1289/ehp.5779>

168. Lee, B. Comparison of selenium bioaccumulation in the clams *Corbicula fluminea* and *Potamocorbula amurensis*: a bioenergetic modeling approach / B. G Lee, J. S. Lee, S. N Luoma // Environmental Toxicology and Chemistry. — 2006. — Vol. 25, iss. 7. — P. 1933–1940. <https://doi.org/10.1897/05-540R.1>

169. Lehoux, J. G. The occurrence of steroids and steroid metabolizing enzyme systems in invertebrates/ J. G. Lehoux, T. Sandor // Steroids. — 1970. — Vol. 16, iss. 2. — P. 141–171. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(70\)80102-7](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(70)80102-7)

170. Leiker, T. J. Identification of methyl triclosan and halogenated analogues in male common carp (*Cyprinus carpio*) from Las Vegas Bay and semipermeable membrane devices from Las Vegas Wash, Nevada / T. J. Leiker, S. R. Abney, S. L. Goodbred, M. R. Rosen // Science of the Total Environment. — 2009. — Vol. 407, iss. 6. — P. 2102–2114. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.009>

171. Leroy, F. Seasonal Variations in Maternal Provisioning of Crepidulafornicata (Gastropoda): Fatty Acid Composition of Females, Embryos and Larvae / F Leroy,

T. Meziane, P. Riera, T. Comtet // PLOS One. — 2013. — Vol. 8. — Article e75316 (19 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075316>

172. Li, N. G. Amino-acid composition of soft tissues of bivalve mollusk *Corbicula japonica* / N. G. Li and T. K. Kalenik // Chemistry of Natural Compounds. — 2018. — Vol. 54, no. 5. — P. 1031–1032. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2546-1>

173. Lipids in Aquatic Ecosystems / Eds: M. T. Arts, M. T. Brett, M. J. Kainz. — Dordrecht ; Heidelberg ; London ; New York : Springer Publishers, 2009. — 377 p.

174. Livingstone, D. R. Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertebrates / D. R. Livingstone // Advances in Comparative and Environmental Physiology. — Berlin : Heilderberg : Springer, 1991. — Vol. 7. — P. 45–185. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-75897-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-75897-3_2)

175. Livingstone, D. R. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids / D. R. Livingstone, J. K. Chipma, D. M. Lowe, C. Minier, R. K. Pipe // International Journal of Environment and Pollution. — 2000. — Vol. 13, no. 1–6. — P. 56–91. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2000.002311>

176. Liu, F. Linking trace element variations with macronutrients and major cations in marine mussels *Mytilus edulis* and *Perna viridis* / F. Liu, W.-X. Wang // Environmental Toxicology and Chemistry. — 2015. — Vol. 34, iss. 9. — P. 2041–2050. <https://doi.org/10.1002/etc.3027>

177. Lowe, D. The cytochemical distributions of zinc (Zn II) and iron (Fe III) in the common mussel, *Mytilus edulis*, and their relationship with lysosomes / D. M. Lowe, M. N. Moore // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. — 1979. — Vol. 59, iss. 4. — P. 851–858. <https://doi.org/10.1017/S0025315400036882>

178. Lupica, S. J. Validation of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of faecal cortisol in fish / S. J. Lupica, J. W. Turner // Aquaculture Research.

— 2009. — Vol. 40, iss. 4. — P. 437–441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02112.x>

179. Malakhova, L. Partitioning and level of organochlorine compounds in the tissues of the Black Sea turbot at the south-western shelf of Crimea / L. Malakhova, V. Giragosov, A. Khanaychenko, T. Malakhova, V. Egorov, D. Smirnov // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. — 2014. — Vol. 14, no. 4. — P. 993–1000. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14\\_4\\_19](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_4_19)

180. Marigómez, I. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs / I. Marigómez, M. Soto, M. P. Cajaraville, E. Angulo, L. Giamberini // *Microscopy Research and Technique*. — 2002. — Vol. 56, iss. 5. — P. 358–392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>

181. Martínez-Pita, I. Influence of microalga lipid composition on the sexual maturation of *M. galloprovincialis*: a hatchery study / I. Martínez-Pita, C. Sánchez-Lazo, F. J. García // *Aquaculture Nutrition*. — 2016. — Vol. 22, iss. 1. — P. 202–216. <https://doi.org/10.1111/anu.12248>

182. Martínez-Pita, I. Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *M. galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain / I. Martínez-Pita, C. Sánchez-Lazo, I. Ruíz-Jarabo, M. Herrera, J-M. Mancera // *Aquaculture*. — 2012. — Vol. 358–359. — P. 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.003>

183. Mathieson, P. Critical appraisal of the evidence for tributyltin mediated endocrine disruption in mollusks / P. Mathieson, P. E. Gibbs // *Environmental Toxicology and Chemistry*. — 1998. — Vol. 17, iss. 1. — P. 37–43. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170106>

184. Matsuo, H. Stable isotope-guided analysis of congener — specific PCB concentrations in a Japanese coastal food web / H. Matsuo, M. Kawano, K. Omori,

K. Nakajima, I. Takeuchi // Marine Pollution Bulletin. — 2009. — Vol. 58, iss. 11. — P. 1615–1623. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.07.007>

185. McDowell, J. The relationship between lipid composition and seasonal differences in the distribution of PCBs in *Mytilus edulis* L. / J. McDowell, J. W. Farrington, H. C. Clifford, P. Rantamaki // Marine Environmental Research. — 1989. — Vol. 28, iss. 1–4. — P. 259–264. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(89\)90240-7](https://doi.org/10.1016/0141-1136(89)90240-7)

186. Mehdi, Y. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body function/ Y. Mehdi, J.-L. Hornick, L. Istasse, I. Dufrasne // Molecules. — 2013. — Vol. 18, iss. 3. — P. 3292–3311. <https://doi.org/10.3390/molecules18033292>

187. Mertz, W. Trace elements in human and animal nutrition. 5th edition / Ed. W. Mertz. — San Diego : Academic Press, 1986. — 480 p.

188. Metz, G. J. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes / G. J. Metz, P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, V. Ray, K. Lardizabal, F. Domergue, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, J. Browse // Science. — 2001. — Vol. 293, iss. 5528. — P. 290–293. <https://doi.org/10.1126/science.1059593>

189. Morris, R. J. Effect of chlorination on the gill lipids of the mussel *Mytilus edulis* / R. J. Morris, F. Culkin, A. P. M. Lockwood, A. C. Jensen // Journal of Chemical Ecology. — 2006. — Vol. 1, iss. 3. — P. 173–189. <https://doi.org/10.1080/02757548308070800>

190. Mubiana, V. K. The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis* / V. K. Mubiana, K. Vercauteren, R. Blust // Environmental Pollution. — 2006. — Vol. 144, iss. 1. — P. 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.017>

191. Müller-Navarra, D. C. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers / D. C. Müller-Navarra, M. T. Brett,

A. M. Liston, C. R. Goldman // Nature. — 2000. — Vol. 403. — P. 74–77.  
<https://doi.org/10.1038/47469>

192. Narváez, M. Food availability and reproduction affects lipid and fatty acid composition of the brown mussel, *Perna perna*, raised in suspension culture / M. Narváez, L. Freites, M. Guevara, J. Mendoza, H. Guderley, C. J. Lodeiros, G. Salazar // Comparative Biochemistry and Physiology — Part B. — 2008. — Vol. 149, iss. 2. — P. 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.09.018>

193. Nelson, M. M. Comparison of growth and lipid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, provided specific macroalgal diets / M. M. Nelson, D. L. Leighton, C. F. Phleger, P. D. Nichols // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. — 2002. — Vol. 131, iss. 73. — P. 695–671. [https://doi.org/101016/S1096-4959\(02\)00042-8](https://doi.org/101016/S1096-4959(02)00042-8)

194. Nelson-Smit, A. Effect oil on marine plants and animals // Water Pollution by Oil / Ed. P. Hepple. – London : Institute of Petroleum, 1971. — P. 273–280.

195. Nikonova, L. L. Total testosterone and estradiol in the gonads and gametes of the mussel *M. galloprovincialis* L. / L. L. Nikonova, M. V. Nekhoroshev, V. I. Ryabushko // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2017. — Vol. 53, iss. 6. — P. 519–522. <https://doi.org/10.1134/S0022093017060114>

196. Norstrom, R. Understanding bioaccumulation of POPs in food webs. Chemical, biological, ecological and environmental considerations / R. Norstrom // Environmental Science and Pollution Research. — 2002. — Vol. 9, iss. 5. — P. 300–303. <https://doi.org/10.1007/bf02987570>

197. Odintsova, N. A. Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* on cultivated marine invertebrate cells / N. A. Odintsova, N. I. Belogortseva, A. V. Ermak, V. I. Molchanova, P. A. Luk'yanov // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research. — 1999. — Vol. 1448, iss. 3. — P. 381–389. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00150-5)

198. Oehlmann, J. Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance / J. Oehlmann, D. B. Benedetto, M. Tillmann, M. Duft, M. Oetken, U. Schulteoehlmann // *Ecotoxicology*. — 2007. — Vol. 16, iss. 1. — P. 29–43. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0109-x>

199. Orban, E. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels *M. galloprovincialis* cultured in two different Italian sites / E. Orban, G. DiLena, T. Navigato, I. Casini, A. Marzetti, R. Caproni // *Food Chemistry*. — 2002. — Vol. 77, iss. 1. — P. 57–65. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00322-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00322-3)

200. Ossipov K. Inductively coupled plasma mass spectrometry in the analysis of biological samples and pharmaceutical drugs / K. Ossipov, I. F. Seregina, M. A. Bolshov // *Russian Chemical Reviews*. — 2016. — Vol. 85, iss. 4. — P. 335–355.

201. Parrish, C. C. Lipids in Marine Ecosystems / C. C. Parrish // *International Scholarly Research Notices*. — 2013. — Article ID 604045 (16). <https://doi.org/10.5402/2013/604045>

202. Patil, V. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed / V. Patil, T. Källqvist, E. Olsen, G. Vogt, H. R. Gislerød // *Aquaculture International*. — 2007. — Vol. 15. — P. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>

203. Perugini, M. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea / M. Perugini, M. Cavaliere, A. Giammarino, P. Mazzone, V. Olivieri, M. Amorena // *Chemosphere*. — 2004. — Vol. 57, iss. 5. — P. 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.034>

204. Peters, J. Role of essential fatty acids on the reproductive success of the copepod *Temora longicornis* in the North Sea / J. Peters // *Marine Ecology Progress Series*. — 2007. — Vol. 341. — P. 153–163. <https://doi.org/10.3354/meps341153>

205. Pettersen, A. K. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel *M. galloprovincialis* larvae / A. K. Pettersen, G. M. Turchini, S. Jahangard, B. A. Ingram, C. D. Sherman //

Aquaculture. — 2010. — Vol. 309, iss. 1. — P. 115–124.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.024>

206. Pilar, S. Organochlorine compounds in mussels cultured in the Ría of Vigo: Accumulation and origin / S. Pilar, Y. Ruiz, A. Alonso, J. F. San // *Chemosphere*. — 2013. — Vol. 90, iss. 1. — P. 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.030>

207. Pirini, M. Changes in fatty acid composition of *M. galloprovincialis* Lmk. fed on microalgal and wheat germ diets / M. Pirini, M. P. Manuzzi, A. Pagliarani, F. Trombetti, A. R. Borgatti, V. Ventrella // *Comparative Biochemistry & Physiology*. — 2007. — Vol. 147B. — P. 616–626. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1695-6>

208. Puccinelli, E. Spatio-temporal variation in effects of upwelling on the fatty acid composition of benthic filter feeders in the southern Benguela ecosystem: Not all upwelling is equal / E. Puccinelli, C. D. McQuaid, M. Noyon // *PLoS One*. — 2016. — Vol. 11, iss. 8. — Article e0161919 (23 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161919>

209. Purdom, C. E. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works / C. E. Purdom, P. A. Hardiman, V. J. Bye, N. C. Eno, C. R. Tyler, J. P. Sumpter // *Chemical and Ecology*. — 1994. — Vol. 8, iss. 4. — P. 275–85. <https://doi.org/10.1080/02757549408038554>.

210. Rainbow, P. S. Cosmopolitan biomonitors of trace metals / P. S. Rainbow, D. J. H. Phillips // *Marine Pollution Bulletin*. — 1993. — Vol. 26, iss. 11. — P. 593–601. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90497-8](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90497-8)

211. Rainbow, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? / P. S. Rainbow // *Environmental Pollution*. — 2002. — Vol. 120, iss. 3. — P. 497–507. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00238-5)

212. Richir, J. The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *M. galloprovincialis* / J. Richir, S. Gobert // *Ecological Indicators*. — 2014. — Vol. 36. — P. 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.06.021>

213. Richir, J. Trace elements in marine environments: occurrence, threats and monitoring with special focus on the coastal Mediterranean/ J. Richir, S. Gobert // *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*. — 2016. — Vol. 6, iss. 1. — Article no. 1000349 (19 p.). <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000349>
214. Rizvi, S. The role of vitamin E in human health and some diseases / S. Rizvi, S. T. Raza, F. Ahmed, A. Ahmad, S. Abbas, F. Mahdi // *Sultan Qaboos University Medical Journal*. — 2014. — Vol. 14, iss. 2. — Article e157–e165.
215. Rowley, A. F. Prostaglandins in non–insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems / A. F. Rowley, C. L. Vogan, G. W. Taylor, A. S. Clare // *Journal of Experimental Biology*. — 2005. — Vol. 208, iss. 1. — P. 3–14. <https://doi.org/10.1242/jeb.01275>
216. Ruiz, Y. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: pollution by PAHs, origin and effects on reproduction / Y. Ruiz, P. Suarez, A. Alonso, E. Longo, A. Villaverde, J. San // *Environmental Pollution*. — 2011. — Vol. 159, iss. 1. — P. 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.031>
217. Saavedra, Y. The effect of size on trace metal levels in raft cultivated mussels (*M. galloprovincialis*) / Y. Saavedra, A. González, P. Fernández, J. Blanco // *Science of the Total Environment*. — 2004. — Vol. 318, iss. 1–3. — P. 115–124. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00402-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00402-9)
218. Saito, H. Lipid and FA Composition of the Pearl Oyster *Pinctada* / H. Saito // *Lipids*. — 2004. — Vol. 39, iss. 10. — P. 997–1005. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1322-3>
219. Saito, H. Unusual novel n-4 polyunsaturated fatty acids in cold-seep mussels (*Bathymodiolus japonicus* and *Bathymodiolus platifrons*), originating from symbiotic methanotrophic bacteria / H. Saito // *Journal of Chromatography A*. — 2008. — Vol. 1200, iss. 2. — P. 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.094>

220. Sajjadi, N. Determination and study the fatty acid contents and their seasonal variations by temperature of a dominant bivalve (*Callista umbonella*) of Haleh Creek / N. Sajjadi, N. Mooraki // *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. — 2016. — Vol. 15, iss. 3. — P. 1134–1143. <https://doi.org/20.1001.1.15622916.2016.15.3.17.5>

221. Sapir, A. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay and a beta-1 adrenergic receptor-based assay for monitoring the drug atenolol / A. Sapir, A. H. Shalev, N. Skalka, A. Bronshtein, M. Altstein // *Environmental Toxicology and Chemistry*. — 2013. — Vol. 32, iss. 3. — P. 585–593. <https://doi.org/10.1002/etc.2078>

222. Schwarz, T. I. Data on the uptake and metabolism of the vertebrate steroid estradiol-17 $\beta$  from water by the common mussel, *Mytilus spp.* / T. I. Schwarz, I. Katsiadaki, B. H. Maskrey, A. P. Scott // *Data in Brief*. — 2016. — Vol. 9. — P. 956–965. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.10.030>

223. Schwarz, T. I. Mussels *Mytilus spp.* display an ability for rapid and high capacity uptake of the vertebrate steroid, estradiol-17 $\beta$  from water / T. I. Schwarz, I. Katsiadaki, B. H. Maskrey, A. P. Scott // *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. — 2017. — Vol. 165 (Pt. B). — P. 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.08.007>

224. Schwarz, T. I. Uptake and metabolism of water-borne progesterone by the mussel, *Mytilus spp.* Mollusca / T. I. Schwarz, I. Katsiadaki, B. H. Maskrey, A. P. Scott // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. — 2018. — Vol. 178. — P. 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.10.016>

225. Scott, A. P. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids / A. P. Scott // *Steroids*. — 2012. — Vol. 78, iss. 2. — P. 1450–1468. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.006>

226. Scott, A. P. Is there any value in measuring vertebrate steroids in invertebrates? / A. P. Scott // *General and Comparative Endocrinology*. — 2018. — Vol. 265. — P. 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.005>

227. Scott, A. P. Measurement of fish steroids in water — a review / A. P. Scott, T. Ellis // *General and Comparative Endocrinology*. — 2007. — Vol. 151, iss. 1–3. — P. 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.11.006>

228. Seeler, J. F. Metal ion fluxes controlling amphibian fertilization / J. F. Seeler, A. Sharma, J. Nestor, R. Bleher, B. Lai, E. G. Schultz, B. M. Hoffman, Carole LaBonne, T. K. Woodruff, T. V. O'Halloran // *Nature Chemistry*. — 2021. — Vol. 13. — P. 683–691. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00705-2>

229. Shariati, F. Review on methods for determination of metallothioneins in aquatic organisms / F. Shariati, S. Shariati // *Biological Trace Element Research*. — 2011. — Vol. 141, iss. 1–3. — P. 340–366. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8740-z>

230. Shcherban, S. A. Size and Age Characteristics and Phenotypic Peculiarities of Somatic Growth of the Black Sea Mollusk *Flexopecten glaber ponticus* (Bivalvia, Pectinidae) / S. A. Shcherban, A. V. Melnik // *Biology Bulletin*. — 2020. — Vol. 47, iss. 8. — P. 920–929. <https://doi.org/10.1134/S1062359020080129>

231. Shimomura, O. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* / O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga // *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. — 1962. — Vol. 59, iss. 3. — P. 223–850. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>

232. Slynko, Yu. V. Genetic changeability by loci COI mtDNA for different coloring of shell phenotypes of Black Sea mussel *M. galloprovincialis* Lam. / Yu. V. Slynko, A. D. Kulikova, E. Slynko, A. A. Soldatov // *Russian Journal of Genetics*. — 2018. — Vol. 54, iss. 8. — P. 944–949. <https://doi.org/10.1134/S1022795418080112>

233. Snyder, M. J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions / M. J. Snyder // *Aquatic Toxicology*. — 2000. — Vol. 48, iss. 4. — P. 529–547. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(00\)00085-0](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(00)00085-0)

234. Soto, M. Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in mussel-watch programmes / M. Soto, M. P. Ireland, I. Marigómez // *Science of The Total Environment*. — 2000. — Vol. 247, iss. 2–3. — P. 175–87. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(99\)00489-1](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(99)00489-1)

235. Stahl, W. Photoprotection by dietary carotenoids: Concept, mechanism, evidence and future development / W. Stahl, H. Sies // *Molecular Nutrition & Food Research*. — 2012. — Vol. 56, iss. 2. — P. 287–295. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100232>

236. Stange, K. Factors affecting phytoplankton species-specific differences in accumulation of 40 polychlorinated biphenyls (PCBs) / K. Stange, D. L. Swackhamer // *Environmental Toxicology and Chemistry*. — 1994. — Vol. 13, iss. 11. — P. 1849–1860. <https://doi.org/10.1002/etc.5620131117>

237. Stanley-Samuelson, D. W. The biological significance of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates / D. W. Stanley-Samuelson // *American Zoologist*. — 1994. — Vol. 34, iss. 6. — P. 589–598. <https://doi.org/10.1093/icb/34.6.589>

238. Stephen, G. G. Pirie Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study / G. G. Stephen, J. S. Brian // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. — 1980. — Vol. 60, iss. 3. — P. 575–590. <https://doi.org/10.1017/S0025315400040273>

239. Suárez, P. Organochlorine compounds in mussels cultured in the Ría of Vigo: Accumulation and origin / P. Suárez, Y. Ruiz, A. Alonso // *Chemosphere*. — 2013. — Vol. 90, iss. 1. — P. 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.030>

240. Subramoniam, T. Steroidal control of vitellogenesis in Crustacea: a new understanding for improving shrimp hatchery production / T. Subramoniam // Proceedings of the Indian National Science Academy. — 2017. — Vol. 83. — P. 595–610.

241. Surm, J. M. Comparative analysis and distribution of omega-3 lcPUFA biosynthesis genes in marine molluscs/ J. M. Surm, P. J. Prentis, A. Pavasovic // PLoS ONE. — 2015. — Vol. 10, iss. 8. — Article e0136301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136301>

242. Tadasi, N. Distribution of prostaglandins in the animal kingdom / N. Tadasi, O. Hiroshi // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism. — 1976. — Vol. 431, iss. 1. — P. 127–131. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(76\)90266-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(76)90266-6)

243. Tamar, I. S. Rapid uptake, biotransformation, esterification and lack of depuration of testosterone and its metabolites by the common mussel, *Mytilus spp.* / I. S. Tamar, I. Katsiadaki, B. H. Maskrey, A. P. Scott // Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. — 2017. — Vol. 171. — P. 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.016>

244. Tamar, I. S. Uptake and metabolism of water-borne progesterone by the mussel, *Mytilus spp.* (Mollusca) / I. S. Tamar, I. Katsiadaki, B. H. Maskrey, A. P. Scott // Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. — 2018. — Vol. 178. — P. 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.10.016>.

245. Tosi, L. DNA methyltransferase activity in the early stages of a sea urchin embryo. Evidence of differential control / L. Tosi, F. Aniello, G. Geraci, M. Branno // FEBS Letters. — 1995. — Vol. 361, iss. 1. — P. 115–117. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00160-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00160-B)

246. Vallack, H. W. Controlling persistent organic pollutants — what next? / H W. Vallack, D. J. Bakker, I. Brandt, E. Broström-Lundén, A. Brouwer, K. R. Bull, C. Gough, R. Guardans, I. Holoubek, B. Jansson, R. Koch, J. Kuylenstierna, A. Lecloux, D. Mackay, P. McCutcheon, P. Mocarelli, R. D. Taalman // Environmental Toxicology and

Pharmacology. — 1998. — Vol 6, iss. 3. — P. 143–175. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(98\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(98)00036-2)

247. Van der Heijden, L. H. Trophic importance of microphytobenthos and bacteria to meiofauna in soft-bottom intertidal habitats: a combined trophic marker approach / L. H. Van der Heijden, M. Graeve, R. Asmus, J. Rzeznik-Orignac, N. Niquil, Q. Bernier, G. Guillou, H. Asmus, B. Lebreton // *Marine Environmental Research*. — 2019. — Vol. 149. — P. 50–66. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.05.014>

248. Varotto, L. DNA damage and transcriptional changes in the gills of *M. galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg) / L. Varotto, S. Domeneghetti, U. Rosani, C. Manfrin, M. P. Cajaraville, S. Raccanelli, A. Pallavicini, P. Venier // *PLOS One*. — 2013. — Vol. 8, iss. 1. — Article e54602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054602>

249. Vishwanath, W. Fishes of the genus *Osteobrama* Heckel of northeastern India (Teleostei: Cyprinidae) / W. Vishwanath, W. S. Lakra, U. K. Sarkar // *Zoos' Print Journal*. — 2007. — Vol. 22, iss. 11. — P. 2881–2884. <https://doi.org/10.11609/JoTT.ZPJ.1794.2881-4>

250. Wakeham, S. Fatty acid and sterol biomarkers as indicators of particulate matter source and alteration processes in the Black Sea / S. Wakeham, G. Beier, A. Joy // *Deep Sea Research. Part A. Oceanographic Research Papers*. — 1990. — Vol. 38, suppl. 2. — P. S943–S968. [https://doi.org/10.1016/S0198-0149\(10\)80018-4](https://doi.org/10.1016/S0198-0149(10)80018-4)

251. Wang, W.-X. Interactions of trace metals and different marine food chains / W.-X. Wang // *Marine Ecology Progress Series*. — 2002. — Vol. 243. — P. 295–309. <https://doi.org/10.3354/meps243295>

252. Wang, W.-X. Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis* / W.-X. Wang, N. S. Fisher // *Marine Ecology Progress Series*. — 1997. — Vol. 161. — P. 103–115. <https://doi.org/10.3354/meps161103>

253. Wang, Y. Selection of bioindicators of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in mollusks in the Chinese Bohai Sea / Y. Wang, T. Wang, A. Li, J. Fu, P. Wang, Q. Zhang, G. Jiang // *Environmental Science & Technology*. — 2008. — Vol. 42, iss. 19. — P. 7159–7165. <https://doi.org/10.1021/es801058u>

254. Weis, J. S. Delayed behavioral effects of early life toxicant exposures in aquatic biota / J. S. Weis // *Toxics*. — 2014. — Vol. 2, iss. 2. — P. 165–187. <https://doi.org/10.3390/toxics2020165>

255. Welborn, J. R. Taurine metabolism in larvae of marine molluscs (Bivalvia, Gastropoda) / J. R. Welborn, D. T. Manahan // *Journal of Experimental Biology*. — 1995. — Vol. 198, iss. 8. — P. 1791–1799. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.8.1791>

256. Wendel, M. Anticancer actions of omega-3 fatty acids-current state and future perspectives / M. Wendel, A. R. Heller // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. — 2009. — Vol. 9, iss. 4. — P. 457–70. <https://doi.org/10.2174/1871520610909040457>

257. Yoshino, T. P. Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines / T. P. Yoshino, U. Bickham, C. J. Bayne // *Canadian Journal of Zoology*. — 2013. — Vol. 91, no. 6. — P. 391–404. <https://doi.org/10.1139/cjz-2012-0258>

258. Zhukova, N. V. Fatty acids of marine mollusks: impact of diet, bacterial symbiosis and biosynthetic potential / N. V. Zhukova // *Biomolecules*. — 2019. — Vol. 9, iss. 12. — Article no. 857 (25 p.). <https://doi.org/10.3390/biom9120857>