

ВЛИЯНИЕ ГИПООСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОЦИТОВ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA* *KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© 2020 Кладченко Е.С.^{a, b, *}, Андреева А.Ю.^a, Кухарева Т.А.^a, Рычкова В.Н.^a,
Солдатов А.А.^a, Миндукшев И.В.^b

^aИнститут биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011, Россия

^bИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург 194223, Россия
e-mail: *kladchenko_ekaterina@bk.ru

Поступила в редакцию 22.04.2020. После доработки 14.11.2020. Принята к публикации 02.02.2021

При помощи методов проточной цитометрии и световой микроскопии исследовано влияние гипоосмотической нагрузки на морфофункциональные показатели гемоцитов анадары (*Anadara kagoshimensis*). Контрольная группа содержалась при солёности 19.6‰, экспериментальная – при 14.8‰ и 8.8‰. В гемолимфе контрольной группы идентифицировано два типа клеток – эритроциты и амёбоциты. Эритроциты были преобладающим типом клеток, их доля составила 92.3±3.9%. Гипоосмотическая нагрузка изменяла это соотношение: число амёбоцитов снизилось в 2.7 раза, а эритроцитов – увеличилось в 7.6 раза. Морфометрические характеристики гемоцитов при этом не претерпевали статистически значимых изменений. По мере снижения солёности в гемолимфе повышалось число эритроцитарных теней (в 3.5 раза при солёности 8.8‰), а у гемоцитов отмечалось усиление продукции активных форм кислорода (АФК) (в 2.6 раза при солёности 8.8‰).

Ключевые слова: гипоосмотический стресс, анадара, гемоциты, проточная цитометрия, световая микроскопия.

DOI: 10.35885/1996-1499-2021-14-1-95-106

Введение

Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) (далее анадара) широко распространена в Индо-Пацифике: от Индии и Шри-Ланки до Индонезии, и от Японии до северного побережья Австралии [Routiers, 1998]. В Чёрном море она впервые была обнаружена у берегов Кавказа в 1968 г. [Киселёва, 1992]. В настоящее время вид представлен вдоль западного и восточного побережья Чёрного моря, массово распространился в Азовском море [Revkov et al., 2008]. Успех инвазии вида в азово-черноморском регионе, в целом, определяется его эврибионтностью: толерантностью к условиям острой гипоксии и сероводородного заражения [Zwaan et al., 1991, 1992; Soldatov et al., 2018], эвритермностью [Лутаенко, 1999], эвригалинностью [Rinaldi, 1985; Чихачёв и др., 1994]. В настоящее время у черноморской популяции анадары изучены гематологические характеристики гемолимфы [Kolyuchkina, Ismailov, 2011], её клеточный состав

[Novitskaya, Soldatov, 2013; Kladchenko et al., 2020], определены параметры антиоксидантного ферментного комплекса, качественного состава каротиноидов [Soldatov et al., 2017], изучены особенности тканевого метаболизма в условиях экспериментальной аноксии [Soldatov et al., 2009].

Освоение анадарой акваторий Азовского моря свидетельствует об успешном решении проблемы адаптации к гипоосмотическим условиям. Это регион с минимальными значениями солёности 5–12‰ [Rinaldi, 1985; Куропаткин и др., 2015]. Однако функциональные основы толерантности данного вида к распреснению изучены слабо. Интерес к данной проблематике определяется также тем, что анадара является перспективным объектом культивирования в прибрежных акваториях Чёрного и Азовского морей. Известно, что нахождение двустворчатых моллюсков в условиях распреснения снижает их устойчивость к болезням, делает более уязвимыми к

действию различных патогенов, в частности *OsHV-1* [Fuhrmann et al., 2016], *Vibrio tapetis* [Reid et al., 2003], *Vibrio parahaemolyticus* [Phuvasate, Su, 2013] и *Marteilia sydneyi* [Butt, Raftos, 2007; Perrigault et al., 2012].

Общераспространённым методом оценки влияния стрессового фактора окружающей среды на организм моллюсков в настоящее время является определение морфологических и функциональных показателей, циркулирующих в гемолимфе клеток – гемоцитов. Гемоциты принимают участие в транспорте веществ, пищеварении и заживлении тканей [Mello et al., 2012; Bachère et al., 2015; Matozzo, 2016], и реализации иммунного ответа [Cochennec-Laureau et al., 2003; Callewaert, Michiels, 2010; Song et al., 2010; Li et al., 2014; Wang et al., 2018].

Известно, что уровень солёности морской воды влияет на качественные и количественные показатели гемолимфы моллюсков, такие как: процентное соотношение типов гемоцитов, способность генерировать активные формы кислорода (АФК), фагоцитарная активность, уровень смертности гемоцитов [Gagnaire et al., 2006; Wang et al., 2012; Wu et al., 2018]. В условиях высокой солёности повышалось число агранулоцитов в гемолимфе американской устрицы (*Crassostrea virginica*) [Fisher, Newell, 1986]. При низкой солёности морской воды снижалось общее число гемоцитов у мидий (*Mytilus coruscus*, *Mytilus edulis*, *Perna viridis*) [Bussell et al., 2008; Wang et al., 2012; Wu et al., 2018], морского петушка *Ruditapes philippinarum* [Reid et al., 2003] и у абалона *Haliotis diversicolor supertexta* [Cheng et al., 2004]. Также регистрировали снижение фагоцитарной активности гемоцитов у мидий (*M. coruscus*, *M. edulis*, *P. Viridis*) [Bussell et al., 2008; Wang et al., 2012; Wu et al., 2018], устрицы *C. gigas* [Gagnaire et al., 2006], абалона *H. diversicolor* [Cheng et al., 2004] и морского моллюска *Chamelea gallina* [Matozzo et al., 2007]. Влияние низкой солёности на способность генерировать АФК было видоспецифично: она возрастала у мидии *M. coruscus* [Wu et al., 2018], устрицы *C. gigas* [Gagnaire et al., 2006] и снижалась у мидии *P. viridis* [Wang et al., 2012], абалона *H. diversicolor* [Cheng et al., 2004], моллюска

Paphia malabarica [Gajbhiye, Khandeparker, 2017]. Уровень смертности гемоцитов возрастал как в условиях низкой, так и высокой солёности [Gagnaire et al., 2006; Gajbhiye, Khandeparker, 2017; Wu et al., 2018].

Исследованию влияния гипоосмотической нагрузки на гемоциты семейства Arcidae посвящено сравнительно мало работ [Zhang et al., 2019]. Показано, что *Anadara granosa* способна выдерживать низкие концентрации солёности морской воды (менее 19%) благодаря закрытию раковины. Однако данная способность сохраняется не более трёх суток, а затем особи погибают [Davenport, Wong, 1986]. Гибель в условиях низкой солёности регистрировали и у такого вида как *Anadara trapezia* [Taylor et al., 2017]. При снижении солёности с 30 до 22‰ возрастало общее число гемоцитов у *Anadara kagoshimensis*, однако дальнейшее распреснение приводило к уменьшению числа гемоцитов. Вместе с тем, увеличивалась фагоцитарная активность гемоцитов и способность к продукции АФК [Zhang et al., 2019].

Эксперименты по влиянию солёности стресса на морфофункциональное состояние гемоцитов представителей семейства Arcidae выполняются преимущественно на моллюсках, обитающих в условиях более высокой солёности. Основываясь на имеющихся в литературе данных, не представляется возможным получить информацию о влиянии гипоосмотической нагрузки на морфофункциональное состояние гемоцитов анадары (*A. kagoshimensis*) – моллюска-вселенца, успешно освоившего Азово-черноморский регион.

Цель настоящей работы – исследовать в условиях эксперимента *in vivo* влияние гипоосмотической нагрузки на морфологические и функциональные характеристики клеток гемолимфы у двустворчатого моллюска-вселенца *A. kagoshimensis*.

Материалы и методы

Особей *A. kagoshimensis* собирали в октябре 2019 г. в прибрежной акватории г. Севастополя. Исследовано 30 экземпляров массой 17.6 ± 1.9 г и высотой створки 30.5 ± 1.0 мм. Для адаптации к лабораторным услови-

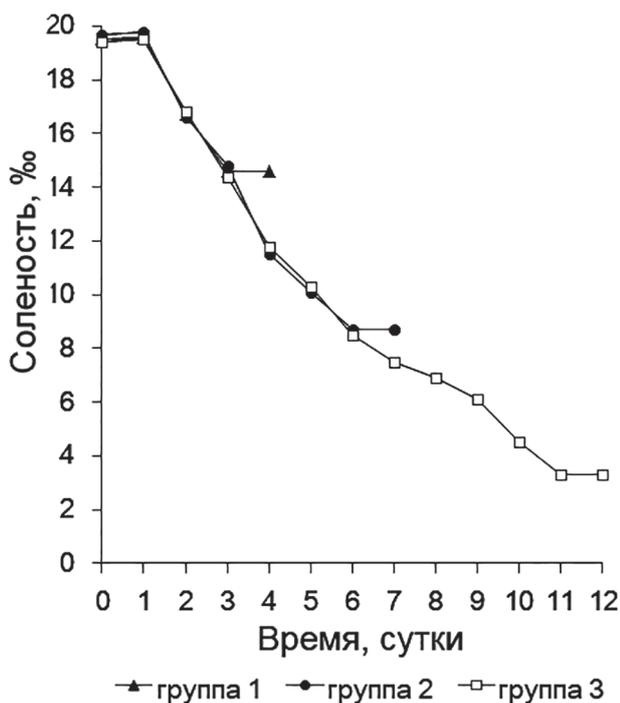


Рис. 1. График акклиматизации анадары к гипоосмотическим условиям: группа 1 – 19.6‰; группа 2 – 14.8‰; группа 3 – 8.8‰.

ям моллюсков содержали в течение недели в ёмкостях с проточной морской водой из расчёта 3–5 л на особь (содержание кислорода – 6.77 мг/л; солёность 19.6‰). Контрольную группу содержали при солёности 19.6‰. Солёность снижали (до 14.8‰ и 8.8‰) путём разбавления морской воды дистиллированной со скоростью $1.3 \pm 0.3\%$ в сутки (рис. 1). Для удаления метаболитов воду в аквариумах меняли ежедневно с сохранением величин солёностей. Моллюсков кормили смесью микроводорослей *Dunaliella salina* и *Diacronema lutheri* (5–10 мл смеси на каждые 50 л аквариумной воды, концентрация клеток $2\text{--}3 \cdot 10^6$ на 1 мл).

Гемолимфу для анализа отбирали стерильным шприцом из экстрапаллиальной полости, затем трижды отмывали в морской воде в течение 5 мин (2500 об./мин) и фильтровали через фильтр с диаметром ячейки 20 мкм. После отмывки часть концентрата клеток использовалась для приготовления мазков. Мазки окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма [Золотницкая, 1987], затем анализировали при помощи светового микроскопа (Biomed PR-2 Lum), оборудованного камерой (Levenhuk C NG Series).

Диаметр клетки (без учёта псевдоподий) и ядра измеряли по фотографиям в программе ImageJ 1.44 р. На каждом мазке подсчитывали 1000 клеток. Ядерно-плазматическое отношение (ЯПО) рассчитывалось по следующей формуле [Carballal et al, 1997]: ЯПО = диаметр ядра / диаметр гемоцита.

Оставшиеся клетки ресуспензировали в морской воде (концентрация гемоцитов $1\text{--}2 \cdot 10^6$ на 1 мл). Для идентификации типов клеток на проточном цитометре Beckman Coulter FC500 готовую суспензию окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (финальная концентрация в пробе 10 мкмоль л⁻¹, время инкубации – 40 мин в темноте). Содержание ДНК в гемоцитах мидий анализировали на основании гистограмм распределения флуоресценции красителя в канале FL1 при помощи программы Flowing Software 5.2. Ось абсцисс на гистограмме распределения флуоресценции красителя отображала содержание ДНК в клетках, а ось ординат – число клеток.

Способность гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода оценивали при помощи метода проточной цитометрии по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетат (DCF-DA). 1 мл суспензий гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль л⁻¹. Флуоресценцию красителя анализировали в канале FL1 (зелёная область спектра).

Смертность гемоцитов определяли при помощи флуоресцентного красителя propidium iodide (PI). К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI (Sigma Aldrich) и инкубировали в темноте в течение 40 мин при 4 °С. Долю мёртвых гемоцитов в общем числе гемоцитов оценивали по гистограммам флуоресценции PI в канале FL4 цитометра.

Калибровку протоколов для анализа гемоцитов проводили при помощи флуоресцентных микросфер следующих диаметров: 0.9, 2.0, 4.2, 5.7 и 9.0 мкм.

Достоверность различий оценивали при помощи U-критерия Манна – Уитни. Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm SE$.

Результаты

1. Идентификация типов клеток в гемолимфе анадары

Проточная цитометрия. Пик флуоресценции красителя SYBR Green I гемоцитов был неоднороден и характеризовался относительно высоким коэффициентом вариации (CV) – 21.28 ± 1.09 . Доля мёртвых клеток в образцах не превышала 1%.

На основании распределения частиц по прямому (FS) и боковому (SS) рассеянию было идентифицировано две субпопуляции клеток с различным относительным размером и уровнем гранулярности (рис. 2). Различия по значениям светорассеяния между субпопуляциями гемоцитов были статистически достоверны. В гемолимфе анадары преобладали крупные клетки, их количество составляло $92.3 \pm 3.9\%$. Субпопуляция 1, характеризовалась более высокими показателями относительного размера и гранулярности в сравнении с субпопуляцией 2 (табл. 1).

Средний диаметр клеток соответствовал 15–16 мкм. Вытянутость облака распределения клеток по оси SS свидетельствовала о большом разбросе уровня гранулярности клеток в субпопуляции.

Субпопуляция 2 была неоднородна по значениям прямого и бокового рассеяния и имела сравнительно низкие значения данных показателей. Значения FS соответствовали среднему диаметру клеток 7–8 мкм, согласно данным калибровки протокола латексными микрочастицами (табл. 1).

Обе субпопуляции клеток характеризовались выраженной флуоресценцией красителя DCF-DA – 935.0 ± 66.2 у. е. для крупных клеток и 822.1 ± 110.2 у. е. для мелких (табл. 1). Различия во флуоресценции красителя статистически были не достоверны.

Светооптическая микроскопия. На препаратах гемолимфы анадары идентифицировано 2 типа клеток: эритроциты и амёбоциты. Эритроциты представляли собой крупные клетки (рис. 3 А), размеры которых

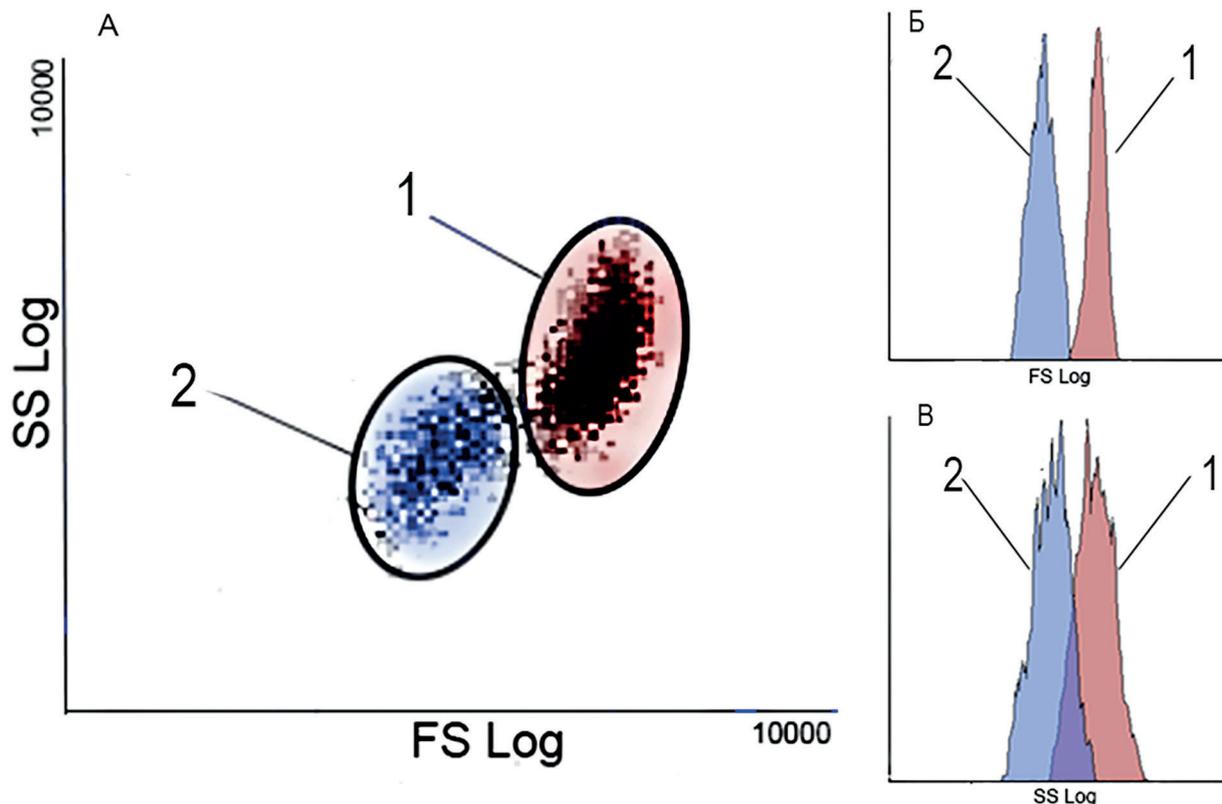


Рис. 2. Характеристика типов гемоцитов *Anadara kagoshimensis* по показателям относительного размера и уровня гранулярности. А – График отношения прямого рассеяния (FSC) и бокового рассеяния (SSC), показывающий две популяции гемоцитов гемолимфы; Б – Гистограмма распределения гемоцитов по относительному размеру (FSC); В – Гистограмма распределения гемоцитов по относительной гранулярности (SSC): 1 – субпопуляция 1; 2 – субпопуляция 2.

Таблица 1. Характеристика субпопуляций гемоцитов анадары

	FS, у.е.	SS, у.е.	DCF, у.е.
Субпопуляция 1	1622.4±46.1	196.4 ±12.4	935.0±66.2
Субпопуляция 2	596.9±49.5*	134.1±17.7 *	822.1±110.2

Примечание: * – различия между субпопуляциями статистически достоверны, $p \leq 0.01$ ($n=10$).

Таблица 2. Морфометрический анализ гемоцитов *Anadara kagoshimensis*

Типы клеток	Диаметр клетки (мкм)			Диаметр ядра (мкм)			ЯПО		
	$\bar{x} \pm SE$	min	max	$\bar{x} \pm SE$	min	max	$\bar{x} \pm SE$	min	max
Эритроциты	15.8±0.8	10.4	23.8	4.3±0.1	2.1	7.93	0.3±0.01	0.1	0.5
Амёбоциты	7.1±0.3*	3.9	12.0	4.3±0.1	2.5	6.29	0.6±0.01*	0.4	0.8

Примечание: * – различия между субпопуляциями статистически достоверны, $p \leq 0.01$

колебались от 10.4 мкм до 23.8 мкм (табл. 2). Они имели округлую форму с небольшим ацентричным ядром, обладающим плотной структурой. Светлая цитоплазма содержала большое число базофильных гранулярных включений, количество которых достигало 23.6 ± 2.1 единиц на клетку.

Амёбоциты – более мелкие клетки, диаметр которых составлял 7.1 ± 0.3 мкм, округлой или вытянутой формы, способные к образованию псевдоподий. Бобовидное ядро, размером 4.3 ± 0.1 мкм, располагалось ацентрично, часто прилегало к одной из сторон цитоплазматической мембраны (рис. 3 Б). Цитоплазма была окрашена в светлые оттенки, гранулярные включения отсутствовали. Поверхность клеток имела неровный контур. Также на мазках наблюдали эритроцитарные тени – элементы, которые образовались в ре-

зультате разрушения эритроцитов. Они выглядели как розоватые пятна, у которых отсутствовали чёткие контуры (рис. 3 В).

2. Влияние соленосного стресса

Проточная цитометрия. Гипоосмотическая нагрузка существенно повлияла на соотношение типов гемоцитов (рис. 4). Снижение солёности с 19.6 до 14.8‰ привело к уменьшению доли амёбоцитов в более чем 2.7 раза и увеличению числа эритроцитов (с 92.3 до 97.2%) ($p \leq 0.05$). При дальнейшем понижении солёности доля амёбоцитов снизилась в 7.6 раза в сравнении с контролем ($p \leq 0.01$). Число эритроцитов, соответственно, возросло. Доля мёртвых клеток в образцах осталась на уровне контроля (<1%).

Снижение солёности с 19.6 до 14.8‰ не оказало воздействия на способность гене-

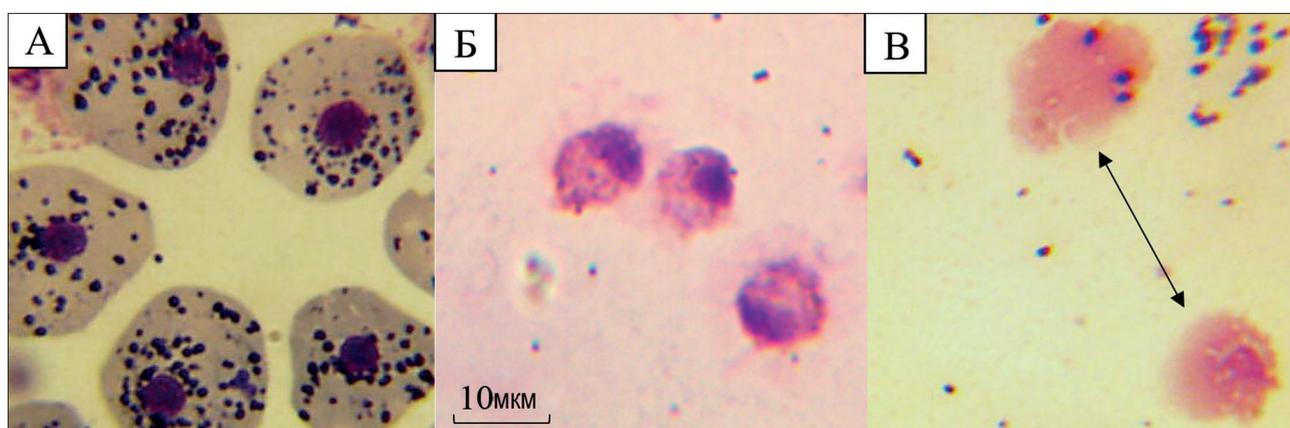


Рис. 3. Микрофотографии клеток гемолимфы *Anadara kagoshimensis*. А – эритроциты; Б – амёбоциты; В – эритроцитарные тени.

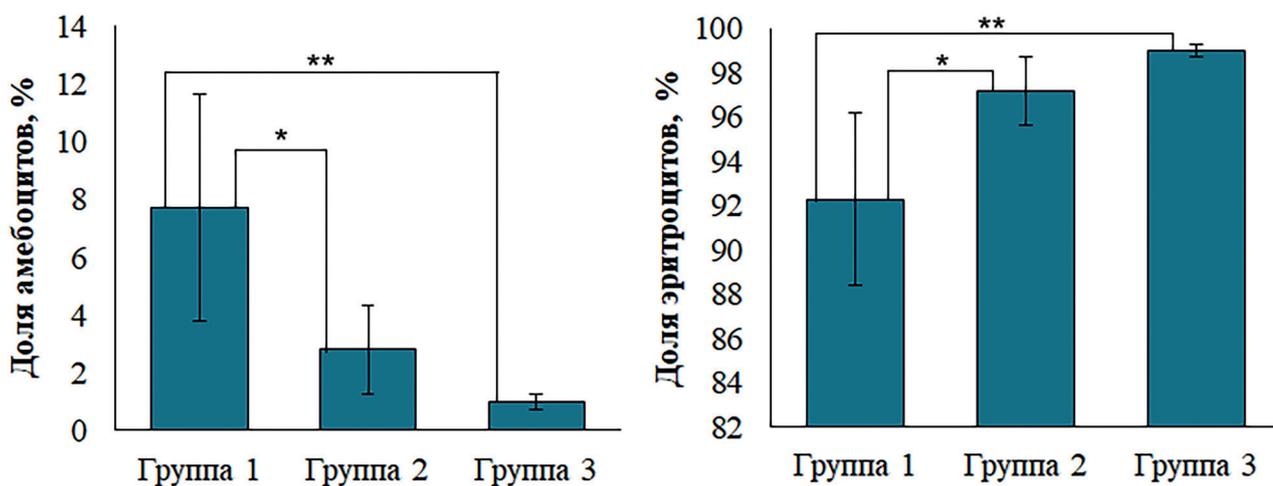


Рис. 4. Соотношение типов гемоцитов: группа 1 – 19.6‰; группа 2 – 14.8‰; группа 3 – 8.8‰.

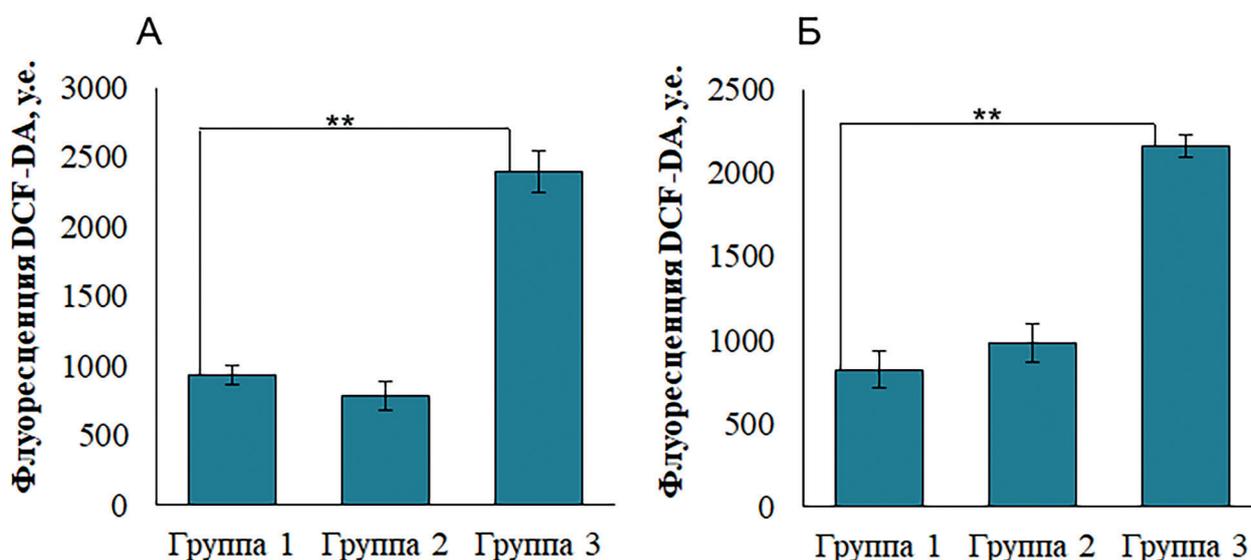


Рис. 5. Влияние гипоосмотического стресса на способность гемоцитов генерировать АФК. А – эритроциты, Б – амёбоциты: группа 1 – 19.6‰; группа 2 – 14.8‰; группа 3 – 8.8‰.

рировать АФК. У группы моллюсков, содержащихся при солёности 8.8‰, напротив, зафиксировано увеличение флуоресценции красителя DCF в 2.6 раза ($p \leq 0.01$). Описанные закономерности были характерны как для эритроцитов (рис. 5 А), так и для амёбоцитов (рис. 5 Б).

Светооптическая микроскопия. В ходе эксперимента было установлено, что гипоосмотическая нагрузка не оказала существенного влияния на размерные характеристики гемоцитов анадары. При солёности 14.8‰ размер эритроцитов составлял 15.3 ± 0.4 мкм, а амёбоцитов – 7.8 ± 0.2 мкм, а при дальнейшем понижении до 8.8‰ диаметры гемоци-

тов соответствовали 17.2 ± 0.1 мкм и 7.2 ± 0.5 мкм.

Размер ядер эритроцитов при снижении солёности с 19.6 до 14.8‰ увеличился на 14% ($p \leq 0.01$), но при 8.8‰ оставался на уровне контрольных значений (рис. 6 А). Что касается величины диаметра ядра амёбоцитов, то она не претерпевала статистически значимых изменений (рис. 6 Б).

Увеличение ЯПО отмечалось для эритроцитов анадары при снижении солёности с 19.6 до 14.8‰ на 17% ($p \leq 0.01$). Дальнейшее уменьшение солёности не оказало существенного воздействия на значения ЯПО у этого типа гемоцитов (рис. 7 А). Осмотиче-

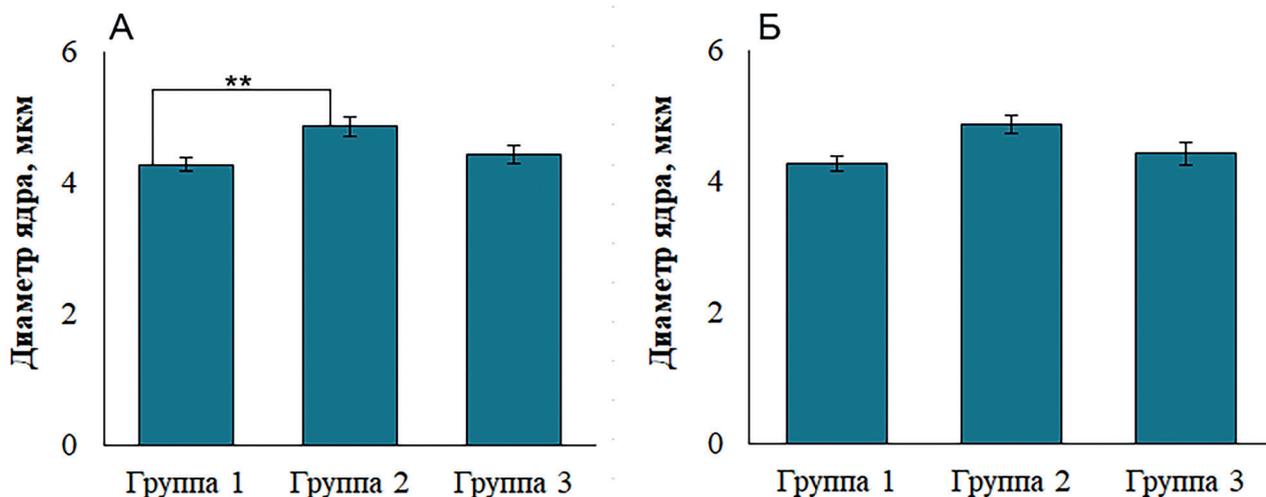


Рис. 6. Морфометрические характеристики ядер клеток при снижении солёности. А – эритроциты, Б – амёбоциты: группа 1 – 19.6‰; группа 2 – 14.8‰; группа 3 – 8.8‰.

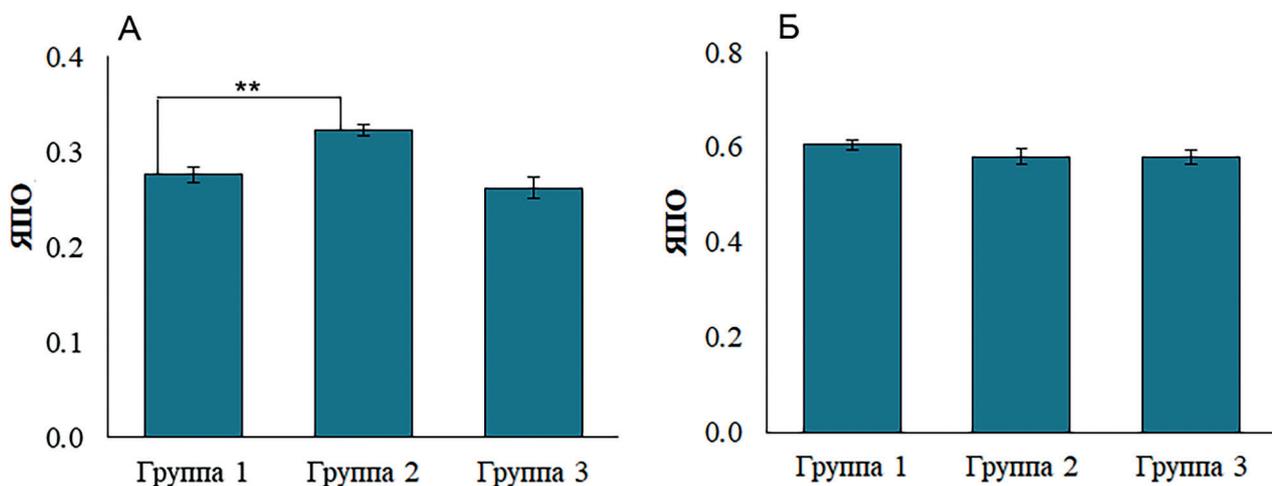


Рис. 7. Ядерно-плазматическое отношение (ЯПО) при изменении солёности. А – эритроциты, Б – амёбоциты: группа 1 – 19.6‰; группа 2 – 14.8‰; группа 3 – 8.8‰.

ский стресс не повлиял на изменение ядерно-плазматического отношения у амёбоцитов (рис. 7 Б). При снижении солёности с 19.6 до 8.8‰ значения ЯПО оставались на уровне контрольных значений 0.6 ± 0.01 у. е.

В эритроцитах моллюсков, которые содержались при солёности 14.8‰, отмечалось увеличение числа гранулярных включений на 25% ($p \leq 0.05$), но при дальнейшем уменьшении солёности до 8.8‰ их количество возвращалось на прежний уровень 28.29 ± 2.9 единиц.

Уровень солёности водной среды влиял на процентное соотношение типов гемоцитов в гемолимфе анадары. При низкой солёности (8.8‰) значительно (в 3.5 раза, $p \leq 0.05$) воз-

растала доля эритроцитарных теней (рис. 8 В). Это приводило к относительному понижению числа эритроцитов в образцах гемолимфы: при 19.6‰ их доля составляла 87.2% от общего числа форменных элементов (эритроцитов, амёбоцитов и эритроцитарных теней), тогда как при 8.8‰ – 78.9% (рис. 8 А). Доля амёбоцитов также снижалась: с 7.7% при 19.6‰ до 2.9% при 8.8‰ (рис. 8 Б). Однако эти изменения не были статистически значимы.

Обсуждение

В гемолимфе анадары при помощи методов проточной цитометрии и световой микроскопии выделено 2 типа клеток. Согласно

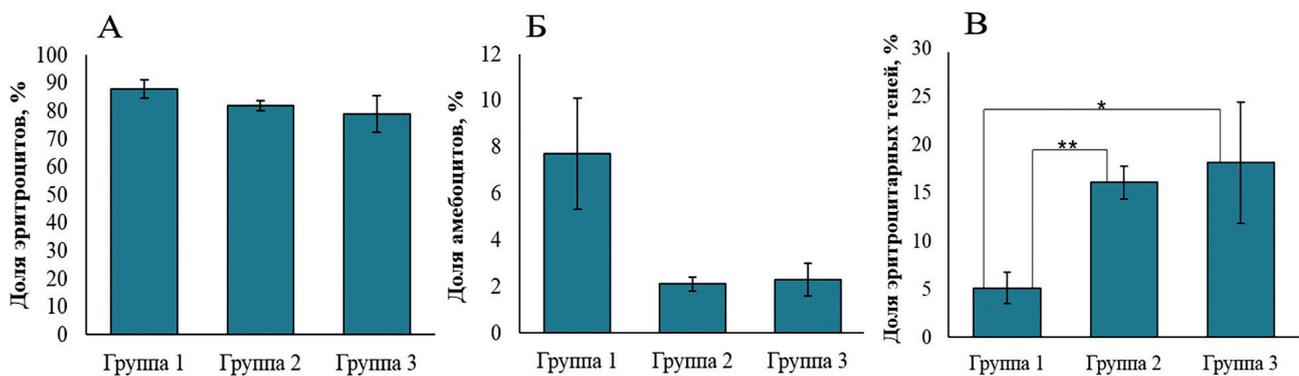


Рис. 8. Соотношение типов гемоцитов в гемолимфе *Anadara kagoshimensis* в зависимости от уровня солёности водной среды. А – доля эритроцитов, Б – доля амёбоцитов, В – доля эритроцитарных теней: группа 1 – 19.6%; группа 2 – 14.8%; группа 3 – 8.8%.

результатам калибровки протокола цитометра микрочастицами, Субпопуляция 1 на гистограмме FS/SS соответствовала эритроцитам анадары, Субпопуляция 2 включала в себя амёбоциты. Морфометрические характеристики эритроцитов и амёбоцитов, описанные в нашем исследовании, в целом, согласовались с описанием клеток анадары других авторов [Holden et al., 1994; Kolyuchkina, Ismailov, 2011; Dang et al., 2013; Novitskaya, Soldatov, 2013]. Кроме этого, морфология эритроцитов и амёбоцитов анадары соответствовала гранулоцитам и агранулоцитам других видов двустворчатых моллюсков [Holden et al., 1994; De Zwaan et al., 1995; Dang et al., 2013]. Последнее подтверждает предположение о том, что в гемолимфе двустворчатых моллюсков присутствует два основных типа клеток – агранулярные и гранулярные [Cajaraville, Pal, 1995; Barcia et al., 1999; Donaghy et al., 2009]. Интересно, что у эритроцитов и амёбоцитов анадары отсутствовали статистические различия во флуоресценции DCF-DA. В то время как гранулярные клетки двустворчатых моллюсков, в частности мидий и устриц, в большей степени способны к генерации АФК, пролиферации, фагоцитозу и продукции защитных пептидов в сравнении с агранулярными [Hegaret et al., 2003; Nakahara et al., 2009; Andreyeva et al., 2019].

Известно, что у моллюсков изменение солёности окружающей среды приводит к изменению осмолярности внутренних сред и, как следствие, изменению клеточного объёма [Bregante et al., 2016]. В нашем исследова-

нии не обнаружено различий в метрических характеристиках клеток. Возможно, это связано со способностью клеток восстанавливать свой объём в анизоосмотических условиях – реакцией регуляторного снижения объёма (RVD). У низших позвоночных RVD осуществляется за счёт выведения из клеток ионов калия и хлора вместе с осмотически связанной водой через K^+-Cl^- симпорт и K^+-H^+ антипорт [Cossins, Gibson, 1997]. Реакция RVD у моллюсков остаётся предметом обсуждения и требует дополнительных исследований [Torre et al., 2013; Bregante et al., 2016]. Вместе с тем, в условиях гипоосмотической нагрузки определённая часть эритроцитов подверглась разрушению. Об этом свидетельствовал рост числа эритроцитарных теней в гемолимфе моллюска. Процесс лизиса, скорее всего, затронул старые эритроидные формы, для которых характерна низкая осмотическая стойкость, такая закономерность описана для низших позвоночных [Иванов, 2003; Андреева, Рябцева, 2011].

В настоящем исследовании снижение солёности до 8.8‰ индуцировало продукцию АФК гемоцитами в сравнении с контролем. Аналогичный результат получен в исследовании Zhang с соавторами при инкубации анадары в гипоосмотических условиях [Zhang et al., 2019]. Генерация окислительного взрыва играет важную роль в защите от микроорганизмов, поскольку АФК в сочетании с лизосомальными ферментами принимают участие в реакции фагоцитоза, способствуя уничтожению условно патогенных объектов

[Hegaret et al., 2003]. С другой стороны, АФК также способны окислять внутриклеточные молекулы, такие как ДНК, белки и липиды клеток. Известно, что факторы среды могут выступать в качестве стрессорных агентов, что повышает риск повреждения клеточных структур и сопровождается нарушением их функций [Hermes-Lima et al., 2015]. В нашем случае это, по-видимому, и имело место, так как рост продукции АФК происходил на фоне увеличения числа эритроцитарных теней в гемолимфе. Известно, что гипоосмотический стресс приводит к уменьшению общего числа гемоцитов у двустворчатых моллюсков вследствие их разрушения [Reid et al., 2003; Cheng et al., 2004; Bussell et al., 2008; Wang et al., 2012; Gajbhiye, Khandeparker, 2017; Wu et al., 2018]. Это совпадает с результатами, представленными в настоящей работе.

Следует отметить, что рост эритроцитарных теней в гемолимфе моллюска в условиях гипоосмотической нагрузки не коррелировал с интенсивностью флуоресценции PI, который позволяет регистрировать мёртвые клетки. Отсутствие совпадений определяется спецификой действия данного красителя. Показано, что PI способен встраиваться в ДНК клеток с повреждённой мембраной. Эритроцитарные же тени представляют собой разрушенные клетки, в которых отсутствуют ядра. Их пигментация определяется присутствием мембраносвязанного гемоглобина [Wong, 2004].

В результате гипоосмотического стресса изменилось соотношение типов гемоцитов. Это важный диагностический показатель функционального состояния организма. Считается, что реализация клеточного иммунного ответа у моллюсков в большей степени осуществляется гранулярными гемоцитами [Cajaraville, Pal, 1995; Varcia et al., 1999; Donaghy et al., 2009]. Функциональные особенности эритроцитов и амёбоцитов анадары до конца не ясны [Dang et al., 2013]. Однако снижение доли амёбоцитов может свидетельствовать о меньшей стойкости данного типа клеток при воздействии стрессовых факторов окружающей среды, в сравнении с эритроцитами. Следует также отметить, что обнаружить тени амёбоцитов на препаратах невоз-

можно в отличие от эритроцитов, которые содержат мембранно-связанный гемоглобин и поэтому окрашиваются.

Заключение

В гемолимфе анадары идентифицировано два типа клеток – эритроциты и амёбоциты. Соленосный стресс не оказал существенного влияния на морфометрические характеристики гемоцитов, однако индуцировал изменения в соотношении типов клеток. В результате гипоосмотического стресса в гемолимфе анадары существенно возросло число эритроцитарных теней. Отмеченные изменения наблюдались на фоне усиления продукции АФК, как следствие развитие окислительного стресса и повышение риска повреждения клеток.

Финансирование работы

Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-50080, а также частично в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ (рег. номер АААА-А 18-118021490093-4 – светооптическая микроскопия).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

Все экспериментальные протоколы были выполнены в соответствии с руководящими принципами ЕС по использованию лабораторных животных и уходу за ними (86/609 / СЕЕ) и при соблюдении правил, утверждённых распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980 N 12000-496 и приказом Минвуза СССР от 13 сентября 1984 N 22. Все усилия были предприняты, чтобы использовать только минимальное количество животных, необходимое для получения надёжных научных данных.

Литература

Андреева А.М., Рябцева И.П. Механизмы адаптации дыхательной функции крови у Teleostei // Вопр. ихтиологии. 2011. Т. 51. № 6. С. 834–843.

- Золотницкая Р.П. Методы гистологических исследований // Лабораторные методы исследований в клинике: Справочник. М.: Медицина, 1987. С. 106–148.
- Иванов А.А. Физиология рыб. М.: Мир, 2003. 284 с.
- Киселёва М.И. Сравнительная характеристика донных сообществ у берегов Кавказа // Многолетние изменения зообентоса Чёрного моря. Киев: Наук. думка, 1992. С. 84–99.
- Куропаткин А.П., Шишкин В.М., Бурлачко Д.С., Карманов В.Г., Жукова С.В., Подмарева Т.И., Лутынская Л.А. Современные и перспективные изменения солёности Азовского моря // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2015. №. 11. С. 7–16.
- Лутаенко К.А. Ожидаемые фаунистические изменения в бассейне Японского моря: влияние климата и уровня моря на распределение двустворчатых моллюсков // Бюллетень Дальневосточного малакологического общества. 1999. Вып. 3. С. 38–64.
- Чихачёв А.С., Фроленко Л.Н., Реков Ю.И. Новый вселенец в Азовское море // Рыбное хозяйство. 1994. Т. 3. С. 40–45.
- Andreyeva A.Y., Efremova E.S., Kukhareva T.A. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters // Fish and Shellfish Immunology. 2019. Vol. 89. P. 361–367.
- Bachere E., Rosa R.D., Schmitt P., Poirier A.C., Merou N., Charrière G.M., Destoumieux-Garzón D The new insights into the oyster antimicrobial defense: cellular, molecular and genetic view // Fish and Shellfish Immunology. 2015. Vol. 46. No. 1. P. 50–64.
- Barcia R., Cao A., Arbeteta J., Ramos-Martinez J.I. The IL-2 Receptor in Hemocytes of the Sea Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk // IUBMB life. 1999. Vol. 48. No. 4. P. 419–423.
- Bregante M., Carpaneto A., Piazza V., Sbrana F., Vassalli M., Faimali M., Gambale F. Osmoregulated chloride currents in Hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* // PloS one. 2016. Vol. 11. No. 12. e0167972.
- Bussell J.A., Gidman E.A., Causton D.R., Gwynn-Jones D., Malham S.K., Jones M.L.M. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2008. 358. P. 78–85.
- Butt D., Raftos D. Immunosuppression in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) and QX disease in the Hawkesbury River Sydney // Marine and Freshwater Research. 2007. 58. P. 213–221.
- Cajaraville M.P., Pal S.G. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment // Cell structure and function. 1995. Vol. 20. No. 5. P. 355–367.
- Callewaert L., Michiels C.W. Lysozymes in the animal kingdom // Journal of biosciences. 2010. Vol. 35(1). P. 127–160.
- Carballal M.J., Lopez M.C., Azevedo C., Villalba A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Diseases of aquatic organisms. 1997. Vol. 29. No. 2. P. 127–135.
- Cheng W.T., Juang F.M., Chen J.C. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels // Fish Shellfish Immunol. 2004. Vol. 16. P. 295–306.
- Cochennec-Laureau N., Auffret M., Renault T., Langlade A. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae* // Journal of invertebrate pathology. 2003. Vol. 83. No 1. P. 23–30.
- Cossins A.R., Gibson J.S. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells // Journal of Experimental Biology. 1997. Vol. 200. No. 2. P. 343–352.
- Dang C., Cribb T.H., Osborne G., Kawasaki M., Bedin A.S., Barnes A.C Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia* // Fish and shellfish immunology. 2013. Vol. 35. No. 3. P. 951–956.
- Davenport J., Wong T.M. Responses of the blood cockle *Anadara granosa* (L.) (Bivalvia: Arcidae) to salinity, hypoxia and aerial exposure // Aquaculture. 1986. Vol. 56. No 2. P. 151–162.
- De Zwaan A., Isani G., Cattani O., Cortesi P. Long-term anaerobic metabolism of erythrocytes of the arcid clam *Scapharca inaequivalvis* // Journal of experimental marine biology and ecology. 1995. Vol. 187. No. 1. P. 27–37.
- Donaghy L., Kim B.K., Hong H.K., Park H.S., Choi K.S. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* // Fish and shellfish immunology. 2009. Vol. 27. No. 2. P. 296–301.
- Fisher W.S., Newell R.I.E. Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica* // The Biological Bulletin. 1986. Vol. 170. No. 1. P. 122–134.
- Fuhrmann M., Petton B., Quillien V., Faury N., Morga B., Pernet F. Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) // Aquaculture Environment Interactions. 2016. Vol. 8. P. 543–552.
- Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., Renault T. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) // Fish Shellfish Immunol. 2006. Vol. 20. P. 536–547.
- Gajbhiye D.S., Khandeparker L. Immune response of the short neck clam *Paphia malabarica* to salinity stress using flow cytometry // Mar. Environ. Res. 2017. Vol. 129. P. 14–23.
- Hegaret H., Wikfors G.H., Soudant P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst // Journal of experimental marine biology and ecology. 2003. Vol. 293. No. 2. P. 249–265.
- Hermes-Lima M., Moreira D.C., Rivera-Ingraham G.A., Giraud-Billoud M., Genaro-Mattos T.C., Campos É.G. Preparation for oxidative stress under hypoxia and met-

- abolic depression: revisiting the proposal two decades later // *Free Radical Biology and Medicine*. 2015. Vol. 89. P. 1122–1143.
- Holden J.A., Pipe R.K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis* // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1994. Vol. 74. No. 2. P. 287–299.
- Kladchenko E.S., Andreyeva A.Y., Kukhareva T.A., Soldatov, A.A. Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes // *Fish and Shellfish Immunology*. 2020. Vol. 98. P. 1030–1032.
- Kolyuchkina G.A., Ismailov A.D. Morpho-functional characteristics of bivalve mollusks under the experimental environmental pollution by heavy metals // *Oceanology*. 2011. Vol. 51. No. 5. P. 804.
- Li J., Zhang Y., Zhang Y., Xiang Z., Tong Y., Qu F., Yu Z. Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // *Fish and shellfish immunology*. 2014. Vol. 40. No. 2. P.455–465.
- Matozzo V. Aspects of eco-immunology in molluscs // *Invertebrate Survival Journal*. 2016. Vol. 13. No. 1. P. 116–121.
- Matozzo V., Monari M., Foschi J., Serrazanetti G.P., Cattani O., Marin M.G. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses // *Mar. Biol.* 2007. Vol. 151. P. 1051–1058.
- Mello D.F., De Oliveira E.S., Vieira R.C., Simoes E., Trevisan R., Dafre A.L., Barracco M.A. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2) // *Marine drugs*. 2012. Vol. 10. No. 3. P. 583–597.
- Nakahara Y., Shimura S., Ueno C., Kanamori Y., Mita K., Kiuchi M., Kamimura M. Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry // *Developmental and Comparative Immunology*. 2009. Vol. 33. No. 4. P. 439–448.
- Novitskaya V.N., Soldatov A.A. Peculiarities of Functional Morphology of Erythroid Elements of Hemolymph of the Bivalve Mollusk *Anadara inaequivalvis*, the Black Sea // *Hydrobiological Journal*. 2013. Vol. 49. No. 6. P. 64–71.
- Perrigault M., Dahl S.F., Espinosa E.P., Allam B. Effects of salinity on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) defense parameters and QPX disease dynamics // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012. Vol. 110. P. 73–82.
- Phuvasate S., Su Y.C. Impact of water salinity and types of oysters on depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) // *Food Control*. 2013. Vol. 32. P. 569–573.
- Poutiers J.M. Gastropods // *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific*. 1998. Vol. 1. P. 363–648.
- Reid H.I., Soudant P., Lambert C., Paillard C., Birkbeck T.H. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* // *Dis. Aquat. Org.* 2003. Vol. 56. P. 249–258.
- Revkov N.K., Abaza V., Dumitrache C., Todorova V., Konsulova T., Mickashavidze E., Kucheruk N.V. The state of zoobenthos // *Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution*. 2008. P. 243.
- Rinaldi E. Alcuni dati significativi sulla proliferazione di *Scapharca inaequivalvis* (Bruguière, 1789) in Adriatico lungo la costa Romagnola // *Bollettino Malacologico*. 1985. Vol. 21. P. 41–42.
- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Sysoeva I.V., Sysoev A.A. Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* Br. under conditions of experimental anoxia // *J. Evolutionary Biochem. Physiol.* 2009. Vol. 45. Iss 3. P. 349–355.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Borodina A.V., Golovina I.V. Glutathione Antioxidant Complex and Carotenoid Composition in Tissues of the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // *J. Evolutionary Biochem. Physiol.* 2017. Vol. 53. Iss. 4. P. 289–297.
- Soldatov A.A., Kukhareva T.A., Andreeva A.Y., Efremova E.S. Erythroid Elements of Hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under Conditions of the Combined Action of Hypoxia and Hydrogen Sulfide Contamination // *Russian J. Mar. Biol.* 2018. Vol. 44. Iss. 6. P. 452–457.
- Song L., Wang L., Qiu L., Zhang H. Bivalve immunity // *Invertebrate immunity*. Springer: Boston, MA, 2010. P. 44–65.
- Taylor A.M., Maher W.A., Ubrihien R.P. Mortality, condition index and cellular responses of *Anadara trapezia* to combined salinity and temperature stress // *Journal of experimental marine biology and ecology*. 2017. 497. P. 172–179.
- Torre A., Trischitta F., Faggio C. Effect of CdCl₂ on regulatory volume decrease (RVD) in *Mytilus galloprovincialis* digestive cells // *Toxicology in Vitro*. 2013. Vol. 27. No. 4. P. 1260–1266.
- Wang L., Song X., Song L. The oyster immunity // *Developmental and Comparative Immunology*. 2018. Vol. 80. P. 99–118.
- Wang Y.J., Hu M.H., Cheung S.G., Shin P.K.S., Lu W.Q., Li J.L. Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity // *Aquaculture*. 2012. Vol. 356. P. 22–29.
- Wong P.A hypothesis on the role of the electrical charge of haemoglobin in regulating the erythrocyte shape // *Med. Hypotheses*. 2004. Vol. 62. No 1. P. 124–129.
- Wu F., Xie Z., Lan Y., Dupont S., Sun M., Cui S., Lu, W. Short-term exposure of *Mytilus coruscus* to decreased pH and salinity change impacts immune parameters of their haemocytes // *Frontiers in physiology*. 2018. Vol. 9. P. 166.
- Zhang M., Li L., Liu Y., Gao X. Effects of a Sudden Drop in Salinity on Immune Response Mechanisms of *Anadara kagoshimensis* // *International journal of molecular sciences*. 2019. Vol. 20. No. 18. P. 4365.
- Zwaan A., Cortesi P., Thillart G., Brooks S, Storey K.B., Roos J. Energy metabolism of bivalves at reduced oxygen tensions // *Mar. Coast. Eutroph.* 1992. P. 1029–1040.
- Zwaan A., Cortesi P., Thillart G., Storey K.B. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: A biochemical analysis // *Mar. Biol.* Berlin. 1991. Vol. 111. No. 3. P. 343–351.

IMPACT OF LOW SALINITY ON HEMOCYTES MORPHOLOGY AND FUNCTIONAL ASPECTS IN INVASIVE CLAM ANADARA KAGOSHIMENSIS (TOKUNAGA, 1906)

© 2020 Kladchenko E.S.^{a, b, *}, Andreyeva A.Yu.^a, Kukhareva T.A.^a, Rychkova V.N.^a, Soldatov A.A.^a, Mindukshev, I.V.^b

^a A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS, Sevastopol 299011, Russia

^b Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St-Petersburg 194223, Russia

e-mail: *kladchenko_ekaterina@bk.ru

Impact of low salinity on morphology and function of hemocytes in ark clam species *Anadara kagoshimensis* was investigated using light microscopy and flow cytometry. In control group the water salinity was adjusted to 19.6‰, and experimental group was maintained at 14.8‰ and 8.8‰. Two cell types, amebocytes and erythrocytes, were identified in control group of ark clams. Erythrocytes constituted the main type of the cells, and amounted to 92.3±3.9 %. Hyposalinity changed that proportion: the number of amebocytes decreased 2.7 times and number of erythrocytes increased 7.6 times. Morphometric characteristics of hemocytes didn't show statistically significant changes. As far as salinity decreased, the number of erythrocyte shades in hemolymph increased (3.5 times at salinity 8.8‰) and, in hemocytes, the reactive oxygen species (ROS) production grew (3.5. times at salinity 8.8‰).

Key words: hyposalinity stress, ark clam, hemocyte, flowing cytometry, light microscopy.